

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE MEDICINA



PAPEL DEL RECEPTOR CCR7 EN ONCOLOGÍA:
CARACTERIZACIÓN MOLECULAR
Y APROXIMACIONES TERAPÉUTICAS

TESIS DOCTORAL

Carlos Cuesta Mateos
Madrid, 2015

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE MEDICINA



PAPEL DEL RECEPTOR CCR7 EN ONCOLOGÍA:
CARACTERIZACIÓN MOLECULAR
Y APROXIMACIONES TERAPÉUTICAS

Carlos Cuesta Mateos

Licenciado en Biología

Director de tesis: Dra. Cecilia Muñoz Calleja

Servicio de Inmunología

Instituto de Investigación Sanitaria

Hospital Universitario de La Princesa

Madrid

2015

La presente tesis doctoral ha sido financiada con ayudas del Ministerio de Educación y Ciencia (PETRI2005/0908), del Fondo de Investigación Sanitaria del Ministerio de Sanidad y Consumo (PI09/01336-PI012/00494), de la Red de Inmunoterapia “INMUNONET” perteneciente al Programa de Cooperación Territorial Sudoeste Europeo (INMUNONET-SOE1/P1/E014), y con capital de la empresa IMMUNOLOGICAL AND MEDICINAL PRODUCTS S.L. (IMMED).

Durante los años 2010-2013, Carlos Cuesta Mateos ha disfrutado de un Contrato del Subprograma Torres-Quevedo cofinanciado por el Ministerio de Ciencia, Innovación y Tecnología y la empresa IMMED (PTQ-09-02-01422). Desde el año 2013 hasta la actualidad, el doctorando ha sido contratado por IMMED.

Corpora non agunt nisi fixata

P. Ehrlich

... A Blanca, a Lucas, a Clara

Agradecimientos

Tiempo, memoria y síntesis, tres condiciones necesarias para escribir una tesis doctoral. Tres condiciones de las que carezco. Es más, adolezco de todo lo contrario. Signo de ello podría ser que, o bien, no he tenido el tiempo suficiente para recordar, o bien, no he sido capaz de recordar a todas las personas a las que tengo algo que agradecer y, aun así, la recapitulación no es concisa. Sin embargo, estoy convencido de que nombro a todas aquellas personas que han repercutido directamente en mi formación y en la realización de este trabajo. Sin ellos, sin sus conocimientos, confianza, consejos, apoyo y cariño, este trabajo, tan lleno de sobresaltos y dificultades, no hubiera sido posible. Piezas grandes o pequeñas, todas han sido indispensables y muy valoradas.

*“No man is an island,
Entire of itself.
Every man is a piece of the continent
A part of the main.
If a clod be washed away by the sea,
Europe is the less.
As well as if a promontory were...”*
John Donne

Gracias,

A Cecilia, mi mentora. Por su cariño, ilusión y dedicación. Por su amistad. Por las alegrías y las decepciones que nos han brindado estos años. Por su paciencia y apoyo.

A Fernando Terrón, por su confianza, persistencia, optimismo y energía.

A Francisco Sánchez Madrid y Manuel Ortiz de Landázuri, y a sus grupos, por su ejemplaridad, comprensión, generosidad, ideas y aportaciones.

A Juan Manuel Zapata. Por su carisma, sus contribuciones, y sus críticas constructivas (y/o cariñosamente destructivas).

A Javier Loscertales. Por tenernos presentes. Por su apoyo incondicional durante tantos años. Por sus conocimientos. Por dejarnos comprender “*el lado clínico*” de nuestro trabajo.

A los pacientes, piedra angular de la investigación biomédica, por su altruismo y generosidad, por su entereza.

A Elena Fernández. Por revisar este escrito. Por su vitalidad y entusiasmo. Por tantos años de seminarios.

A nuestro grupo. Porque hemos sido un grupo pequeño, porque hemos trabajado muchísimas horas en un laboratorio pequeño, porque vamos a tener una repercusión enorme. A Sonia López, Manuel, Beatriz, Cristina, Eva y Dani. A Sonia Chamorro. A Anna y Nathan, por tantas tardes de Ciencia y Columpios.

A todos los técnicos de laboratorio, capital humano y de conocimiento de valor incalculable. A Ana Ramírez, Toñi, Pilar Cañas, Reyes, Víctor, Ángeles Ursa, Isabel, Mariano y Alicia. Por su labor encomiable. Por su calidez. Por los “San Viernes”, por los “San Lunes”, por los “porque sí” y por los que tengan que venir.

A todos los residentes. A Fernando, Marta, Guille, Ainara, Carmen, Dani, Sara, Edu, Paco, Jorge, Alberto, Alicia, Itxaso, Bea, Eva, Álvaro, Federico, Anita y Cande. Por su autenticidad, amistad, paciencia, confianza y *Karaokes*. Puede que las 10.000 horas que hemos pasado juntos no sean suficientes para ser expertos inmunólogos, pero seguro que son necesarias para no olvidaros y para que no olvidéis mis conocimientos inservibles y mis anualmente repetidas *freaky*-historias de abuelo cebolleta.

A los doctores Marisa Toribio, Patricia Fuentes, Miguel Ángel del Pozo, Ángeles García Pardo, Paloma Sánchez Mateos, Leonor Kremer, Gema Pérez Chacón, Carlos Gamallo, Elena Fernández, Valle Gómez García de Soria, Juan José Pérez Villar, Satu Mustjoki y Marco Herling. Por sus valiosas contribuciones en distintas etapas de este proyecto.

A M^a Ángeles Vallejo, por hacer posible mi primer contrato post-BIR. Por tantos favores.

A todos aquellos con los que he coincidido en La Princesa y me han ofrecido su ayuda y/o amistad. A Nicté, Amalia, Vanesa, Isidoro, Hortensia, Aitana, Manolo G, Mónica S, Mónica G, Manu P, Marta B, Mercedes R, Román, Esteban V, Aránzazu C, Emilio T, Cristina G, Giulia, Javi R, Noa, Maria José, Eugenio, Noe, Almudena, Norman, Isabel O, Olga B, Ana U, Rafa, Javi, MiguelVi, Cristina D, M^a José C, Mónica F, Raquel B, Gloria M, Toño, Pablo H, Elena, Susana C, Andrea N, Elia, Cristina V, Julián A, Ángel O, Inés S, Silvia, Esther F, Kostas, Alfonso, Maika, Bárbara A, Luis del Peso, Marisa, Diego, Mati, Marta T, Samu, Pedro M, Paqui... A todos los demás, los no nombrados, gracias, y disculpad.

A mi tío Antonio y a Pilar Pardo, por fomentar desde muy pequeño mi vocación por la Biología.

A mis amigos. A Edu, Espi, Lorena, Laura, Marcos, Javi, Ali, Jimmy, Pablo, Miguelón. Por toda una vida. Por vuestra idiosincrasia. Por vuestros hombros, abrazos, y bofetones. Porque juntos somos mezcolanza; ¿extraña y confusa?, ¡sí!, ¿ridícula?, ¡jamás! Porque no tenéis ni idea de este trabajo y aun así siempre os interesáis por él. Porque os quiero.

A mi familia política. A Toya, Colorín, Gudrun, Pita, Beltrán, Carmen, Irene, Blanquita, Amparo, Pedro, Borja, Juan, la “abuelita” y a al tándem Luciana-Isca. Por acogerme como uno más. Por el cariño y apoyo recibido.

A mis hermanos. Bárbara, Patricia, Alejandra y Javier. Por los recuerdos. Por nuestra infancia (super 8), nuestra adolescencia (VHS) y edad adulta (DVD). Por nuestros sueños. Porque erais mis heroínas. Porque era vuestro héroe. Por nuestra unidad y libertad. Por nuestras alegrías, lágrimas, reuniones, separaciones. Porque ser hermano es una condición que hay que trabajar, y nuestros resultados, son excepcionales. Porque os quiero. Porque me queréis.

A mis padres y a mis abuelos. Por ser espejo de mí mismo. Porque el reflejo me enorgullece. Por vuestro ejemplo. Por vuestra calidez, calma, lucha, sacrificio y dedicación. Por la educación que nos habéis dado. Por enseñarnos a respetar. Por respetar nuestras decisiones. Por apoyarnos de forma incondicional. Por abrirnos los ojos. Por no mirar cuando era necesario. Por haceros los dormidos. Por permanecer despiertos. Por vuestra equidad. Por ayudar al que más lo necesitaba. Por hacer las cosas siempre fáciles. Por hacernos felices. Por ser felices. Por mejorar cada día. Por hacernos sentir afortunados. Porque somos afortunados.

A Lucas, a Clara, a Blanca... Por todo lo que se ve y lo que no se ve. Por ese sentimiento. Porque sé que dicho sentimiento está dentro del significado más bonito que pueda tener una palabra. Porque no sé que palabra es.

He tenido un hijo, he plantado un árbol, he escrito una tesis... ahora, lo siguiente es...

Resumen / Summary

El receptor de quimiocinas CCR7 media la migración linfocitaria en condiciones de homeostasis y de enfermedad. Sin embargo, en los últimos años este receptor se ha identificado como una de las moléculas más relevantes en el proceso de diseminación ganglionar en neoplasias linfoides y epiteliales. Por ello, los principales objetivos de la presente tesis han sido: profundizar en los mecanismos mediados por CCR7 que contribuyen a la enfermedad tumoral, y estudiar las potenciales aproximaciones terapéuticas dirigidas contra dicho receptor. Concretamente, y de forma más extensa, se ha desarrollado un plan experimental con el fin de validar la eficacia de la inmunoterapia con un anticuerpo monoclonal (AcMo) dirigido contra CCR7 para el tratamiento de varias enfermedades tumorales. Como resultado, sabemos que este AcMo se caracteriza por presentar un mecanismo de acción doble y único que, por un lado, bloquea la entrada de la célula tumoral a los nichos de supervivencia y proliferación, y por otro, induce la muerte de aquellas células que expresan el receptor gracias a su capacidad para activar mecanismos efectores citotóxicos. Además, hemos constatado que el AcMo contra CCR7 es útil en aquellos grupos de pacientes con las mayores necesidades terapéuticas, ya que su mecanismo de acción es independiente de los mecanismos de resistencia a tratamientos previos. Por último, hemos demostrado que dicha molécula presenta un potencial de uso muy extendido en el área de la oncología pues se ha mostrado efectiva en tres clases de tumores hematológicos y uno epitelial. Por todo ello, podemos concluir que la inmunoterapia basada en un AcMo contra CCR7 es una herramienta novedosa y prometedora en la terapia del cáncer y esperamos poder disponer de ella en la clínica en los próximos años.

The chemokine receptor CCR7 mediates lymphocyte migration in healthy and disease condition. However, relevant roles in CCR7-mediated tumor cell spread and metastasis have been uncovered in recent years. Based on this, this thesis is focused on two main objectives: to have a better understanding of the pro-tumoral CCR7-triggered molecular mechanisms, and, to study new therapeutic venues targeting the receptor. Specifically, we have developed an extended experimental approach in order to validate a monoclonal antibody (mAb) targeting CCR7 in a number of neoplasias. We have shown that this kind of mAb displays a double and unique mechanism of action. On the one hand, this blocks tumor cell migration into pro-survival and proliferative tumor microenvironments. On the other hand, this mAb is highly effective at triggering cytotoxic effector mechanism against tumor cells expressing CCR7. Moreover, we have shown that this mAb is effective in patients with high medical needs regardless of any previous treatments. Finally, we have confirmed a potential extended utility of this mAb in the field of Oncology as it is effective in three haematological malignancies and one adenocarcinoma. On the basis of the results shown in this thesis, we can conclude that a therapy based on a CCR7-targeting mAb is a novel and promising tool in cancer, so we hope to see a short bench-to-bed transition in the coming years.

Índice

Abreviaturas	1
Introducción	9
1. Receptores de quimiocinas y sus ligandos	11
1.1. Quimiocinas	11
1.2. Receptores de quimiocinas	12
1.3. Eje quimiocina-receptor y enfermedad tumoral	13
2. CCR7 (C-C chemokine receptor 7)	14
2.1. CCR7: señalización celular	14
2.2. CCR7 y enfermedad tumoral	15
2.3. CCR7 como diana terapéutica en patología tumoral	16
3. Leucemia linfocítica crónica (LLC)	16
3.1. Características clínicas y epidemiología	16
3.2. Diagnóstico, estadificación y pronóstico	17
3.3. Etiopatogenia	18
3.4. LLC y microambiente tumoral	19
3.5. Genoma de la LLC: anomalías citogenéticas y oncogenes	20
3.6. Terapia en LLC	21
3.7. Pacientes con necesidades terapéuticas urgentes	21
3.8. Papel de CCR7 en LLC	22
3.9. Modelos <i>in vivo</i> de LLC	23
4. Leucemia prolinfocítica T (LPLT)	24
4.1. Características clínicas y epidemiología	24
4.2. Diagnóstico	24
4.3. Factores pronósticos	24
4.4. Etiopatogenia	24
4.5. Genoma de la LPLT: alteraciones citogenéticas y oncogenes	25
4.6. Terapia en LPLT y en pacientes con necesidades terapéuticas urgentes	25
4.7. Papel de CCR7 en LPLT	25
4.8. Modelos <i>in vivo</i> de LPLT	26
5. Cáncer de mama (CM)	26
5.1. Características clínicas y epidemiología	26
5.2. Terapia en CM y en pacientes con necesidades terapéuticas urgentes	26
5.3. Papel de CCR7 en CM	26
6. Inmunoterapia del cáncer	27
6.1. Inmunoterapia del cáncer basada en anticuerpos monoclonales (AcMo)	27
6.1.1. Aspectos estructurales y funcionales de los AcMo	27
6.1.2. Receptores de la región Fc de las inmunoglobulinas	29

6.1.3.	Mecanismos de acción (MDA) de los AcMo.....	30
Objetivos.....		33
Materiales y Métodos.....		37
1.	Muestras de LLC y LPLT	39
2.	Líneas celulares.....	39
3.	Reactivos.....	39
4.	Niveles de expresión en superficie de CCR7, CD52 y CD20.....	40
5.	Citotoxicidad celular dependiente de complemento (CDC).....	40
6.	Citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC)	40
7.	Supervivencia y apoptosis.....	40
8.	Proliferación.....	41
9.	Migración	41
10.	Invasión	42
11.	Ensayos de migración trans-endotelial (TEM)	42
12.	Zimografía en gelatina	42
13.	Microscopía de fluorescencia.....	42
14.	Western blot (WB).....	42
15.	Pull-down de RhoA	43
16.	Modelo <i>in vivo</i> de linfoma de célula del manto (LCM)	43
17.	Modelo <i>in vivo</i> de leucemia de célula T	44
18.	Análisis estadísticos	44
Resultados		45
1.	CCR7 como diana terapéutica en LLC	47
1.1.	Caracterización de las vías de señalización molecular: migración y supervivencia.....	47
1.1.1.	PI3K y ROCK controlan la migración inducida por CCR7	48
1.1.2.	PI3K, ERK y JNK median supervivencia celular inducida por CCR7	50
1.2.	Terapia con AcMo dirigidos contra CCR7 en LLC.....	51
1.2.1.	Caracterización <i>in vitro</i> del MDA del AcMo.....	51
1.2.2.	Evaluación <i>in vivo</i> de la eficacia terapéutica del AcMo	54
1.2.3.	Eficacia terapéutica en pacientes de LLC de alto riesgo.....	57
2.	CCR7 como diana terapéutica en otros desórdenes linfoproliferativos	64
2.1.	Terapia con AcMo dirigidos contra CCR7 en LPLT.....	64
2.1.1.	Caracterización <i>in vitro</i> del MDA del AcMo.....	65
2.1.2.	Evaluación <i>in vivo</i> de la eficacia terapéutica del AcMo	67
2.1.3.	Eficacia terapéutica en pacientes de LPLT de alto riesgo.....	68

3.	CCR7 como diana terapéutica en tumores de origen epitelial	69
3.1.	Caracterización <i>in vitro</i> del MDA del AcMo	69
Discusión.....		73
1.	Señalización inducida por CCR7 en células tumorales: migración y supervivencia	75
2.	Inmunoterapia contra CCR7.....	78
2.1.	Inhibidores de las vías de señalización de CCR7	78
2.2.	AcMo contra CCR7.....	80
2.2.1.	Mecanismo de acción dual y único	80
2.2.2.	Células inmunoregulatoras y microambiente tumoral.....	83
2.2.3.	Toxicidad y efectos secundarios	84
2.2.4.	Indicaciones en pacientes de alto riesgo	85
2.2.5.	Escenario clínico (I)	87
2.2.6.	Escenario clínico (II).....	87
Conclusiones		89
Bibliografía.....		93
Anexos		121
Publicaciones científicas del doctorando durante su tesis doctoral		123
Premios concedidos al doctorando durante su tesis doctoral		124

Abreviaturas

Para las abreviaturas y acrónimos se han empleado aquellos más frecuentemente utilizados, correspondiendo en su mayoría a términos en inglés. En el texto, aquellas abreviaturas y acrónimos correspondientes a genes se indican en cursiva (ej. *TP53*), las correspondientes a proteína en fuente normal (ej. P53).

7-AAD: 7-aminoactinomicina-D

aa: aminoácido

Ac: anticuerpo

AcMo: anticuerpo monoclonal

ADCC: citotoxicidad celular dependiente de Ac, *antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity*

ADCP: citotoxicidad celular dependiente de fagocitosis, *antibody-dependent cell-mediated phagocytosis*

Ag: antígeno

AKT o PKB: proteína quinasa B, *protein kinase B*

AM: forma mutada constitutivamente activada, *activated mutant*

ANOVA: análisis de la varianza, *analysis of variance*

APC (a continuación de un marcador, ej. CD3-APC): fluorocromo aloficocianina, *allophycocyanin*

APC: célula presentadora de antígeno, *antigen-presenting cell*

ATM: ataxia telangiectasia mutado, *ataxia telangiectasia mutated*

Bcl-2: proteína 2 de linfoma de célula B, *B-cell lymphoma 2*

BCR: receptor de la célula B, *B-cell receptor*

BMSC: células estromales de médula ósea, *bone marrow stromal cells*

Btk: tirosina quinasa de Bruton, *Bruton's tyrosine kinase*

C: región constante de las cadenas de las inmunoglobulinas

CD: grupo de diferenciación, *cluster of differentiation*

CDC: citotoxicidad dependiente de complemento, *complement-dependent cytotoxicity*

CDR: regiones determinantes de complementariedad, *complementary determining regions*

Células NK: células asesinas naturales, *natural killer cells*

Células NLC: células tipo nodriza, *nurse-like cells*

CG: centro germinal

CK: quimiocina, *chemokine*

CKR: receptor de quimiocina, *chemokine receptor*

CM: cáncer de mama

CMF: citometría de flujo

CTLA-4: antígeno 4 del linfocito T citotóxico, *cytotoxic T-lymphocyte antigen 4*

DC: célula dendrítica, *dendritic cell*

del-: delección cromosómica

DN: forma mutada dominante negativa carente de función, *dominant negative*

DNA: ácido desoxirribonucleico, *deoxyribonucleic acid*

EMR: enfermedad mínima residual

ERK1/2: quinasa 1/2 regulada por señal extracelular, *extracellular-regulated kinase-1/2*

Fab: fragmento o región de unión a Ag, *fragment antigen-binding*

FAR: LLC refractaria a fludarabina y alemtuzumab, *fludarabine and alemtuzumab refractory*

FBS: suero fetal bovino, *fetal bovine serum*

Fc: fragmento o región cristalizable o constante, *fragment crystallizable*

FcγRs: receptores de Fc para IgG, *Fc γ receptor*

FCR: terapia combinada con fludarabina, ciclofosfamida y rituximab

FcRn: receptor de Fc neonatal, *neonatal Fc receptor*

FDC: células dendríticas foliculares, *follicular dendritic cells*

FISH: hibridación fluorescente in situ, *fluorescence in situ hybridization*

FITC: fluorocromo isotiocianato de fluoresceína, *fluorescein isothiocyanate*

FOXP3: factor de transcripción *forkhead box P3*

GDP: guanosín difosfato

GFP: proteína fluorescente verde, *green fluorescent protein*

GL: ganglio linfático

GPCR: receptores acoplados a proteína G, *G protein-coupled receptors*

GTP: guanosín trifosfato

H: cadena pesada de las inmunoglobulinas, *heavy chain*

HEV: vénulas de endotelio alto, *high endothelium venules*

HSTC: trasplante de precursores hematopoyéticos, *hematopoietic stem cell transplantation*

HUVEC: células endoteliales de vena umbilical humana, *human umbilical vein endothelial cells*

IC: control de isotipo, *isotype control*

ICAM-1: molécula de adhesión intercelular 1, *intercellular adhesion molecule 1*

IFN- γ : interferón gamma

Ig: inmunoglobulina

IgVH: regiones variables de las cadenas pesadas de las inmunoglobulinas

IL: interleucina

IL-R: receptor de interleucina

IT: inmunoterapia

ITAM: motivo de inmunorreceptor activado por tirosina, *immunoreceptor tyr-based activation motifs*

ITIM: motivo de inmunorreceptor inhibido por tirosina, *immunoreceptor tyr-based inhibitory motifs*

JNK: quinasa del extremo N-terminal de c-Jun, *c-Jun N-terminal kinase*

kD: kiloDalton

L: cadena ligera de las inmunoglobulinas, *light chain*

LAL: leucemia aguda linfoblástica

LCM: linfoma de células del manto

LFA-1: antígeno 1 asociado a función del linfocito, *lymphocyte function-associated antigen 1*

LLC: leucemia linfocítica crónica

LLC-RF: leucemia linfocítica crónica refractaria a fludarabina

LNH: linfoma no Hodgkin

LPLT: leucemia prolinfocítica T

LTA: Linfoma/Leucemia T del adulto

MAC: complejo de ataque a membrana, *membrane attack complex*

MAdCAM-1: molécula de adhesión celular 1 adresina de la mucosa, *mucosal vascular addressin cell adhesion molecule 1*

MAPK: proteínas quinasa activadas por mitógeno, *mitogen-activated protein kinases*

MAT: microambiente tumoral

MDA: mecanismo de acción

MDSC: células supresoras derivadas de linaje mieloide, *myeloid-derived suppressor cells*

MEC: matriz extracelular

MEK: MAPK de la ERK quinasa, *MAPK/ERK kinase*

MIF: media-mediana de la intensidad de fluorescencia

miRNA: micro RNA

MLC: cadena ligera de la miosina, *myosin light chain*

MMP: metaloproteínasa de la matriz, *matrix metalloproteinase*

MO: médula ósea

MTCP-1: proteína 1 de proliferación de célula T madura, *mature T cell proliferation 1*

NOTCH-1: proteína 1 homóloga a Notch, *Notch homolog 1*

OLP: órgano linfoide primario

OLS: órgano linfoide secundario

p38SAPK: proteína quinasa activada por estrés p38, *p38 stress-activated protein kinase*

PB: fluorocromo *pacific blue*

PBMC: células mononucleares de sangre periférica, *peripheral blood mononuclear cells*

PBS: tampón fosfato salino, *phosphate-buffered saline*

PD-1: proteína 1 de muerte celular programada, *programmed cell death protein 1*

PE: fluorocromo ficoeritrina, *phycoerythrin*

PEST: dominio proteico rico en prolina (P), ácido glutámico (E), serina (S), y treonina (T)

PI3K: fosfatidilinositol-3-OH-quinasa, *phosphatidylinositol-3-OH-kinase*

PNA: análogos del nucleósido purina, *purine nucleoside analogs*

PP: placas de Peyer

PTX: toxina pertúsica, *pertussis toxin*

RMFI: intensidad mediana de fluorescencia relativizada, *relative median of fluorescent intensity*

RNA: ácido ribonucleico, *ribonucleic acid*

ROCK: quinasa asociada a la proteína Rho, *Rho-associated protein kinase*

SNC: sistema nervioso central

SP: sangre periférica

SR: Síndrome de Richter

SS: Síndrome de Sézary

TAM: macrófagos asociados a tumor, *tumor-associated macrophages*

TCL-1: proteína 1 de leucemia/linfoma de célula T, *T-cell leukemia/lymphoma 1*

TCR: receptor de la célula T, *T-cell receptor*

Tdt: deoxinucleotidil terminal transferasa, *terminal deoxynucleotidyl transferase*

TEM: migración transendotelial, *trans-endothelial migration*

TGF- β : factor de crecimiento tumoral- β , *transforming or tumor growth factor β*

TIL: linfocitos infiltrantes de tumor, *tumor-infiltrating lymphocytes*

TKI: inhibidor de tirosina quinasa, *tyrosine-kinase inhibitor*

TLS: estructuras linfoides terciarias, *tertiary lymphoid structures*

TMC: linfocito T de memoria central

TNF: factor de necrosis tumoral, *tumor necrosis factor*

TRC: fibroblastos reticulares de la zona T, *T-zone fibroblastic reticular cells*

Treg: células T CD4⁺ reguladoras

V: región variable de las cadenas de las inmunoglobulinas

VLA-4: antígeno de expresión muy tardía 4 o integrina $\alpha 4\beta 1$, *very late antigen 4*

ZAP-70: proteína quinasa asociada a la cadena ζ , *zeta-chain-associated protein kinase 70*

Introducción

1. Receptores de quimiocinas y sus ligandos

Los receptores de quimiocinas (CKR) acoplados a proteínas G y sus péptidos ligando, las quimiocinas (CK), son piezas clave en la defensa inmunitaria porque dirigen y controlan la migración, activación, diferenciación y supervivencia de todos los leucocitos del organismo ^{1,2}.

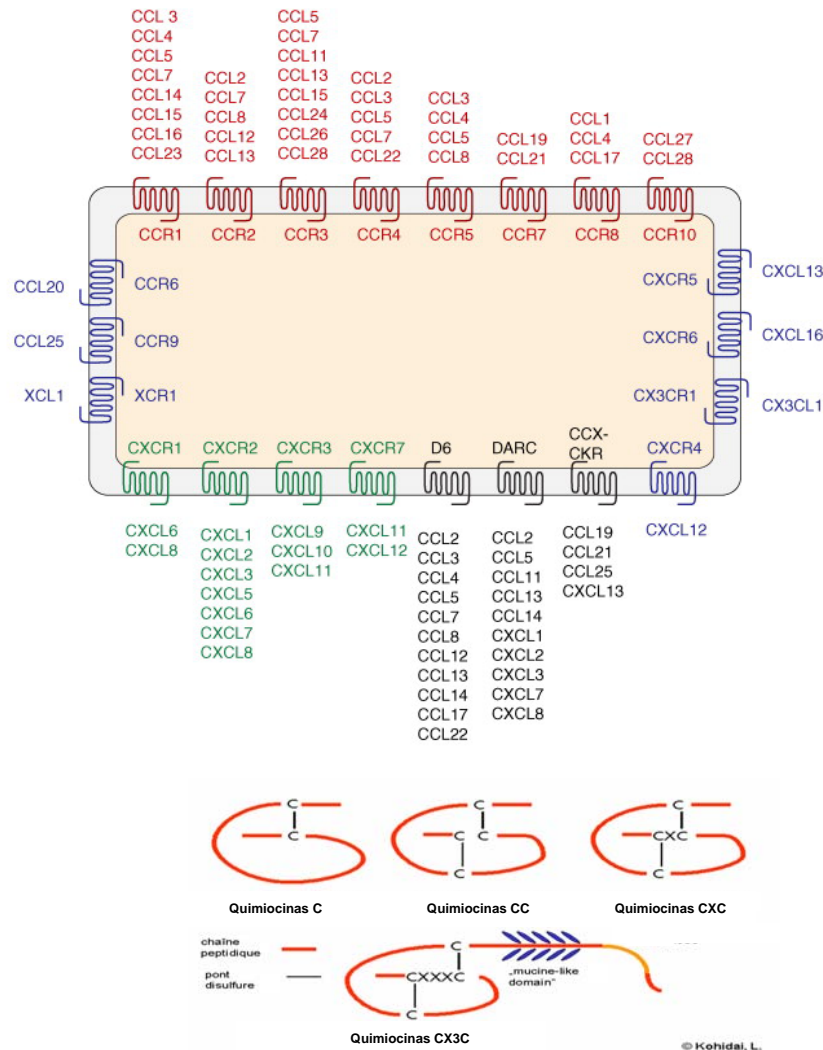


Figura 1. Familias de quimiocinas y receptores de quimiocinas. Como se aprecia en la imagen, modificada de Lazennec *et al* (2010) y Köhida (2008), la mayoría de las CK puede unirse a varios receptores y, por tanto, un único receptor puede interactuar con múltiples CK. Este es el caso de la mayoría de las CK de la familia CC (rojo) y de la familia CXC (verde) aunque existe una minoría de receptores (azul) con un único ligando conocido ³. Se nombran CK y CKR según el sistema de nomenclatura sistemática que combina los motivos estructurales (XC, CC, CXC y CX3C) con L (de ligando) y el número de su gen respectivo ^{4,5}.

1.1. Quimiocinas

Las quimiocinas (CK) son un grupo de citocinas de bajo peso molecular (7-15kD) con propiedades quimioatrayentes selectivas que comparten homología estructural y actúan en gradiente para controlar el tráfico de las células inmunitarias y la homeostasis ^{5,6}. Hasta la fecha, al menos 50 CK humanas han sido identificadas y agrupadas en 4 familias (**Figura 1**) en base al patrón de

espaciamiento de los dos residuos cisteína (cys) altamente conservados de su extremo N-terminal ^{2,5,6}; son las familias CC, CXC, CX3C y XC. De forma alternativa, las CK se clasifican según su patrón de expresión. Una minoría pertenece al grupo de CK homeostáticas, expresadas de forma constitutiva en tejido linfóide, piel y mucosas. Están implicadas tanto en el *homing* o migración guiada de los leucocitos a tejidos específicos durante la hematopoyesis en la médula ósea (MO) y el timo, como en la vigilancia inmunológica dentro de los órganos linfoides secundarios (OLS) y en los tejidos periféricos ². El resto pertenece al gran grupo de CK inducibles. Secretadas en respuesta a mediadores inflamatorios y en presencia de tumores, funcionan como quimioatrayentes paracrinos de leucocitos ². El grupo de CK de la familia CXC promueve, además, la angiogénesis ⁷.

1.2. Receptores de quimiocinas

Las CK median señales a través de unos 20 CKR conocidos y expresados principalmente en leucocitos (**Figura 1**), aunque están también presentes en muchos otros tipos celulares como células endoteliales, estromales, epiteliales, de músculo liso y neuronas ¹. La mayoría de los CKR pueden unir dos o más CK, mientras que otros son altamente específicos de un único ligando ². Los CKR se clasifican de acuerdo con el tipo de CK que unen seguido de un número indicando su orden de descubrimiento ^{2,5}. Los CKR son proteínas de aproximadamente 350 aa con siete dominios transmembrana que forman tres lazos intracelulares y tres extracelulares. Pertenecen a la superfamilia de receptores acoplados a proteínas G heterotriméricas (GPCR) (**Figura 2**) y, por tanto, señalizan preferentemente a través de dichas moléculas ^{2,5}, excepto CXCR7, que señaliza únicamente a través de la β -arrestina ⁸, y tres receptores (D6, DARC y CCX-CKR) que no señalizan y por ello se les conoce como grupo de receptores trampa (del inglés *Decoy*) o “*deceptores*” y cuya principal función es eliminar CK del microambiente extracelular limitando así el reclutamiento de leucocitos ⁹.

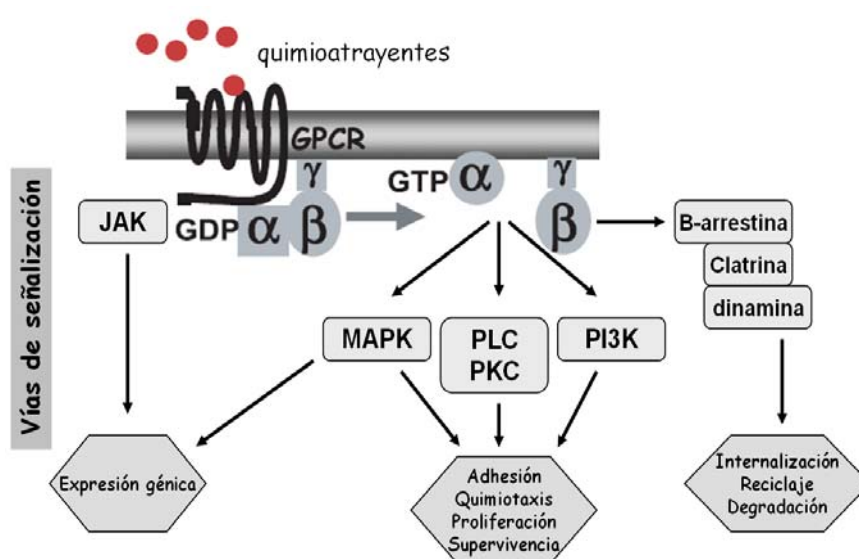


Figura 2. Esquema de señalización de CKR a través de proteínas G heterotriméricas. Se muestran las vías de señalización principales implicadas tras la unión de las CK y las funciones celulares resultantes. Modificado de Jin Ket al (2008) ¹⁰.

1.3. Eje quimiocina-receptor y enfermedad tumoral

En el caso concreto de la biología tumoral, los pares CK-CKR reclutan células inmunitarias que dirigen y orquestan la respuesta antitumoral. Sin embargo, los ejes CK-CKR son frecuentemente usurpados por células tumorales inhibiendo así dicha respuesta (**Figura 3**). Por ejemplo, la célula tumoral puede secretar CK que reclutan células inmunosupresoras como las células T reguladoras (Treg), los macrófagos asociados a tumor (TAM) y las células supresoras derivadas de linaje mieloide (MDSC) que inhiben la inmunidad antitumoral y mantienen un ambiente tolerogénico ⁶. Las células tumorales también pueden producir CK pro-angiogénicas ¹¹, o encontrar en los CKR un mecanismo de diseminación a través del torrente sanguíneo o linfático ¹². El efecto neto para el desarrollo del tumor dependerá de la composición y estado de activación del infiltrado inmunitario en el microambiente tumoral (MAT) ¹³.

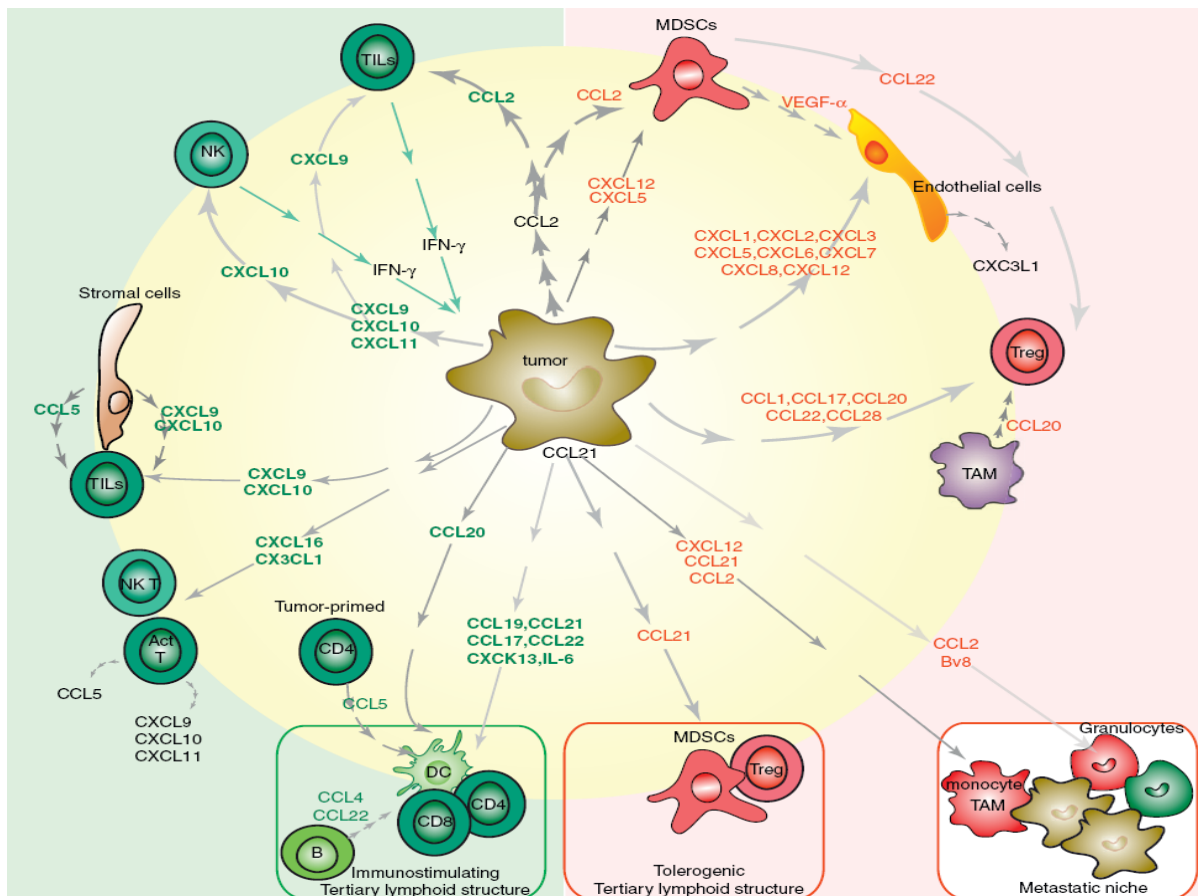


Figura 3. Papel dual de las quimiocinas y sus receptores en la progresión del cáncer. En la figura, extraída de Viola *et al* (2012) ⁶, se muestran CK liberadas directamente por células tumorales que actúan sobre células de la inmunidad innata y adaptativa bien para favorecer (parte derecha, rojo) o inhibir (parte izquierda, verde) el desarrollo del tumor y la metástasis tumoral (parte inferior, los TAM y granulocitos prometastásicos se muestran en rojo, mientras que los granulocitos antimetastásicos se muestran en verde). Los leucocitos infiltrantes, además, liberan citocinas y CK que pueden amplificar o controlar los efectos mediados por el sistema inmunológico. MDSC, células supresoras derivadas de linaje mieloide; TAM, macrófagos asociados a tumor; TIL, linfocitos infiltrantes de tumor; ActT, linfocitos T activados; DC, célula dendrítica; Treg, célula T reguladora.

2. CCR7 (C-C chemokine receptor 7)

El receptor 7 de CK de la familia CC o CCR7 (EBI1, BLR2, CD197)^{14,15}, y sus ligandos, las moléculas CCL21 (SLC, 6Ckine) y CCL19 (ELC, MIP3 β)¹⁶⁻¹⁸ pertenecen al grupo de CKR y CK con función homeostática. Este conjunto dirige la migración de células dendríticas (DC) semi-maduras desde los tejidos periféricos a los ganglios linfáticos (GL)¹⁹ donde presentan antígenos (Ag) a linfocitos T *naïve*, a células T de memoria central (TMC) y a células Treg, que también requieren de CCR7 para entrar en el GL²⁰⁻²². Los ligandos de CCR7, presentes en el lumen de vénulas del endotelio alto (HEV) y vasos linfáticos^{23,24} así como en las zonas T de los GL y placas de Peyer (PP)^{25,26}, también atraen a células B y células NK a los GL²⁰⁻²²; de hecho, los ratones deficientes en CCR7 tienen GL y PP muy pobres en células linfoides y DC debido a que estos tipos celulares no pueden seguir los gradientes quimiotácticos hacia estas localizaciones^{20,27} y en caso de entrar, salen de forma rápida vía vasos eferentes^{20,28}. Además, ambas CK pueden inducir el estado de alta afinidad de las integrinas α L β 2 (LFA-1) y α 4 β 7 promoviendo, respectivamente, adhesión linfocitaria a ICAM-1²⁹ o a MAdCAM-1³⁰. A pesar de que los primeros estudios en ratones deficientes en el receptor o los ligandos no permitieron discriminar efectos dispares entre ambas CK, su diferente patrón de expresión tisular *in vivo* indicaba distintos papeles^{20,31}. Este hecho ha quedado demostrado más recientemente con ratones deficientes (*knock-out*) en CCL21 o con modelos múridos transgénicos con expresión de CCR7 humano^{32,33}, gracias a los cuales sabemos que CCL19 no participa necesariamente en la arquitectura del GL mientras que CCL21 sí.

2.1. CCR7: señalización celular

La unión de CCR7 a sus ligandos provoca que la subunidad G α_i de la proteína G se disocie del heterodímero G $\beta\gamma$ y se activen distintas vías de señalización intracelular necesarias para la activación de integrinas, movilización de calcio y quimiotaxis y, por tanto, para el *homing* mediado por CCR7³⁴⁻³⁶.

En poblaciones linfoides, CCR7 induce motilidad celular a través de enzimas de la familia PI3K (fosfatidilinositol-3-OH-quinasa) de clase I²⁹, que son enzimas implicadas en señalización de los GPCR a través de la proteína efectora serina/treonina quinasa AKT/PKB³⁷. La clase IA, característicamente activada por la subunidad G α_i ^{38,39}, comprende heterodímeros compuestos por una subunidad catalítica p110 (α , β o δ) y una subunidad reguladora p85 (α , β o γ) que varían según el tipo celular. Por ejemplo, en células B la migración mediada por CCR7 depende de PI3K δ ⁴⁰.

En otros tipos celulares, las vías de las MAPK (proteínas quinasa activadas por mitógeno) toman el relevo de la familia PI3K en motilidad celular y en la activación de integrinas. En DC (**Figura 4**), tres de las principales MAPK de mamífero regulan de forma no sinérgica y dependiente de G α_i la quimiotaxis hacia los agonistas de CCR7: ERK1/2 (quinasa regulada por señal extracelular), p38SAPK (proteína quinasa activada por estrés) y JNK1/2/3 (quinasa del extremo N-

terminal de c-Jun) ⁴¹⁻⁴⁴. Tanto la familia de MAPK como la familia de PI3K no sólo participan en respuestas quimiotácticas sino que también intervienen en la supervivencia celular ^{45,46}.

Otra familia de proteínas involucrada en la respuesta quimiotáctica mediada por CCR7 son las pequeñas GTPasas de la familia Rho, que incluye las proteínas Cdc42, Rac y Rho. En concreto, RhoA regula la quimiotaxis hacia los ligandos de CCR7 en células B ⁴⁷ y en células T ⁴⁸, que a través de su efector, la serina/treonina quinasa ROCK (quinasa asociada a la proteína Rho), aumenta la activación de la cadena ligera de la miosina (MLC), regula la retracción del urópodo, y dirige la migración celular ^{48,49}.

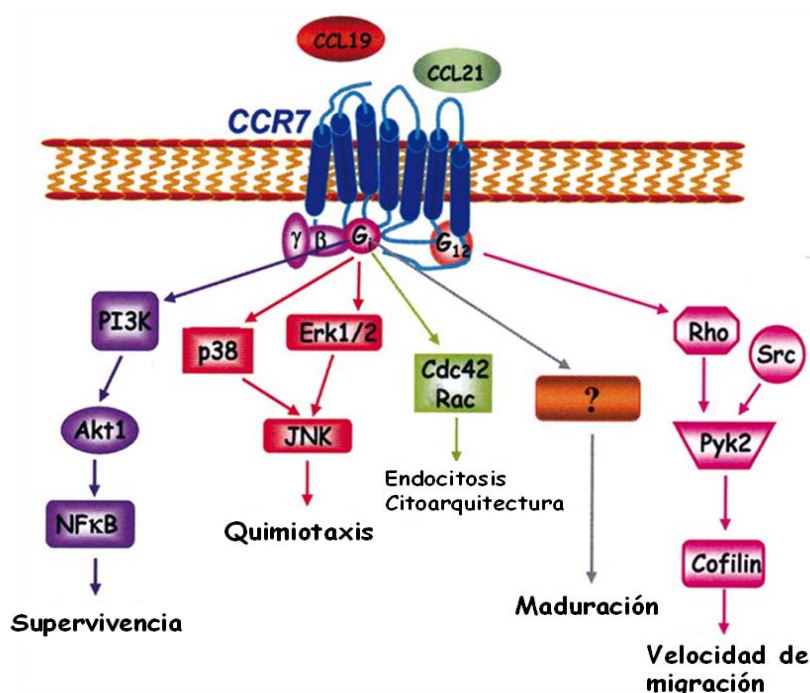


Figura 4. Vías de señalización que se activan en respuesta a CCL19 y CCL21 en células dendríticas. Modificado de Riol-Blanco *et al* (2005) ⁴³.

2.2. CCR7 y enfermedad tumoral

En enfermedades tumorales, las mismas vías y mecanismos usados por CCR7 para conducir a las células inmunitarias a los GL están implicados en el desarrollo de metástasis a ganglios centinelas e incluso a órganos no linfoides como el sistema nervioso central (SNC), donde pueden replicarse y escapar de los agentes terapéuticos presentes en sangre periférica (SP) ^{50,51}. Estos mecanismos son especialmente importantes en el caso de leucemias y linfomas de linaje B o T que, debido a su origen, muy frecuentemente expresan CCR7 ⁵²⁻⁵⁴, pero no son exclusivos de tejido linfoide y son también muy relevantes en tumores de origen epitelial ^{55,56}. Gracias a este mecanismo de *homing* a GL, las células del tumor primario se diseminan siguiendo gradientes de CCL21 procedentes del vaso linfático más próximo ⁵⁷ o gradientes transcelulares autocrinos de CCL19 y CCL21 ⁵⁸. Una vez en el GL, CCR7 favorece la supervivencia o la proliferación de la célula tumoral a través de la señalización

de PI3K/AKT o ERK1/2 ^{59,60}. Además, CCR7 también participa en la tumorigénesis mediante mecanismos indirectos. Si la célula tumoral secreta los ligandos de CCR7 en el MAT, puede reclutar células inmunitarias Treg y MDSC inmunosupresoras que ayudan a crear un microambiente tolerante pobre en interferón gamma (IFN- γ) y rico en factor de crecimiento tumoral (TGF- β) ^{61,62}. A la vista de la importante diversidad de mecanismos protumorales mediados por CCR7 no resulta extraña la gran variedad de tumores sólidos en los que la presencia del receptor se asocia con mayor agresividad y reducida supervivencia, entre los que destacan el cáncer de mama ⁶³, el melanoma ⁶⁴, el melanoma uveal ⁶⁵, el cáncer de célula pequeña de pulmón ⁶⁶ o el cáncer de páncreas ⁶⁷.

2.3. CCR7 como diana terapéutica en patología tumoral

A medida que sabemos más sobre la compleja biología del ambiente tumoral, CCR7 gana fuerza como potencial diana farmacológica para la intervención terapéutica en pacientes con cáncer. Por un lado, CCR7 puede ser diana de agentes biológicos y no biológicos con actividad citotóxica sobre la célula tumoral. Por otro lado, inhibir la función y la señalización inducida por este receptor puede ser una herramienta terapéutica útil para inhibir el crecimiento tumoral y prevenir la formación de metástasis. Aunque numerosas leucemias, linfomas y tumores sólidos podrían ser patologías candidatas a inmunoterapia dirigida contra este receptor ⁶⁸, la presente tesis se ha centrado en el estudio de un número limitado de enfermedades que cumplieran con al menos uno de los siguientes requisitos: curso clínico agresivo, limitadas opciones terapéuticas y documentada relevancia de CCR7 en la biología de la enfermedad. Dichas enfermedades son: la leucemia linfocítica crónica (LLC), la leucemia prolinfocítica T (LPLT), y el cáncer de mama (CM).

3. Leucemia linfocítica crónica (LLC)

3.1. Características clínicas y epidemiología

La LLC es un desorden linfoproliferativo maligno de células B clonales que se acumulan en SP, MO y tejidos linfoides. Es la leucemia más común en adultos en países occidentales ⁶⁹ con una incidencia de 13 casos por 100.000 personas y por año a la edad de 65 años, la edad media de diagnóstico ⁶⁹. Clínicamente, se caracteriza por una marcada heterogeneidad. Muchos pacientes son asintomáticos al diagnóstico mientras que otros presentan anemia hemolítica autoinmune, infecciones, esplenomegalia, hepatomegalia, linfadenopatía o infiltrados extranodulares ^{70,71}. Algunos pacientes padecen una enfermedad estable con una esperanza de vida elevada mientras que otros pueden sucumbir en un periodo relativamente corto de tiempo ⁷². Aproximadamente un 3% de los casos evoluciona a una forma muy agresiva conocida como Síndrome de Richter (SR), cuya supervivencia media es inferior a un año ⁷³.

3.2. Diagnóstico, estadificación y pronóstico

Para el diagnóstico de la LLC se valoran el recuento del clon de células B patológicas (linfocitosis > 5.000 células/ μ L) durante 2 o más meses, la presencia del clon en MO y el inmunofenotipo de las células B ⁷⁴. La LLC presenta un inmunofenotipo distintivo caracterizado por la co-expresión de CD19, CD5 y CD23 y pérdida de expresión de CD20 y de inmunoglobulinas (Ig) en la membrana celular (generalmente IgM aunque también de forma combinada IgM e IgD) ⁷⁴. Dichas Ig de superficie muestran expresión monoclonal de las cadenas ligeras (Kappa o Lambda). Otros rasgos distintivos son la negatividad para ciclina D1 y CD10 ⁷⁴, y el aumento de expresión de CCR7 ⁵⁴. En ocasiones la LLC presenta un fenotipo atípico (CD5-, CD23-) ⁷⁴.

Los dos sistemas de estadificación en LLC más usados son el sistema de Rai ⁷⁰, usado sobre todo en EEUU, y el de Binet ⁷¹, más usado en Europa (**Tabla 1**). Ninguno de los dos sistemas identifica qué pacientes pueden tener enfermedad indolente o progresiva y no predicen respuesta al tratamiento, sin embargo, correlacionan con la supervivencia del paciente ⁷⁵. El sistema de clasificación de Rai incluye 5 estadios (0, I, II, III y IV) ⁷⁰ mientras que el sistema de Binet, divide a los pacientes en tres estadios: A, B y C ⁷¹. En general, los pacientes en estadios más avanzados o en el grupo de alto riesgo (Rai III-IV y Binet C) tienen una esperanza de vida de 1-2 años, mientras que los pacientes con el estadio más bajo o enfermedad temprana (Rai 0 y Binet A) tienen una supervivencia mediana de más de 10 años y no suelen ser tratados ^{70,71}. Los pacientes en la categoría de riesgo intermedio (Rai I-II o Binet B) tienen una supervivencia global mediana de 7 a 9 años.

Clasificación de Binet (1981)			Clasificación de Rai (1975)				Super- viven- cia ²
Estadio	Definición	% *	Grupo de riesgo	Estadio	Definición	%*	
A	Linfocitosis con aumento de 2 o menos áreas linfoides, sin anemia ⁽¹⁾ o trombocitopenia	60	Bajo	0	Linfocitosis	30	>10
B	Linfocitosis con aumento de más de 3 áreas linfoides, sin anemia o trombocitopenia	30	Intermedio	I	Linfocitosis y linfadenopatías	25	
				II	Linfocitosis, linfadenopatía y esplenomegalia y/o hepatomegalia	25	7-9
C	Linfocitosis con anemia y/o trombocitopenia	10	Alto	III	Linfocitosis y anemia ⁽²⁾	10	
				IV	Linfocitosis y trombocitopenia	10	1-2

Tabla 1. Sistemas de estadificación en LLC. En los sistemas de clasificación de Binet y de Rai son parámetros críticos el recuento de plaquetas, el nivel de hemoglobina en SP y el número de áreas afectadas por la LLC. El sistema Rai se ha simplificado a riesgo bajo (estadio 0), riesgo intermedio (estadios I-II) y riesgo alto (estadios III-IV). *, % de pacientes en cada estadio al diagnóstico. Anemia: Hemoglobina <10 g/dl (1) ó <11 g/dl (2); trombocitopenia (plaquetas $<100 \times 10^3$ /dl). Modificado de Sagatys *et al* (2012) ⁷⁵.

Junto con los sistemas de estadificación de Binet y Rai se usan factores pronósticos para estratificar el riesgo de progresión de la enfermedad y predecir la respuesta al tratamiento ⁷⁵. Algunos de estos factores, los más establecidos, se describen brevemente en la **Tabla 2**.

Marcador	Supervivencia mediana (años)
IgVH mutado (>2% diferencia con la línea germinal)	24
IgVH no mutado o segmento génico VH3-21	8
CD38 >30%	<10
CD38 <30%	>15
ZAP-70 >20%	6-10
ZAP-70 <20%	>15
VLA-4	9-11
del 13q	17
del 11q	6-8
Trisomía 12	9-11
del 17p	2-3
Citogenética normal	9-11

Tabla 2. Marcadores pronósticos frecuentemente usados en LLC. Modificado de Sagatys et al (2012) ⁷⁵.

3.3. *Etiopatogenia*

Las neoplasias linfoides parecen recapitular estadios de la diferenciación normal de su linaje correspondiente. Sin embargo, algunas patologías, como la LLC, no se corresponden con un claro estadio normal de diferenciación. El fenotipo característico de la LLC no recuerda el de ningún linfocito B normal, y aunque presenta algunas similitudes con las células B1 humanas, las células B de memoria y las células B de la zona marginal ⁷⁶, el origen de la LLC sigue sin conocerse. Sin embargo, en los últimos años está ganando fuerza la hipótesis de que esta enfermedad sea resultado de un proceso de selección y expansión clonal de células B auto-reactivas ⁷⁷. El análisis de los genes de las Ig y de los perfiles de expresión génicos han definido dos tipos de LLC que difieren en su tendencia a la progresión de la enfermedad ⁷⁸. Una primera, de peor pronóstico (35-40% de los casos), parece surgir de células B diferenciadas antes de su entrada en el centro germinal (CG), ya que los genes de las regiones variables de las cadenas pesadas de las Ig (IgVH) coinciden con los de la línea germinal, es decir, están libres de mutaciones somáticas ⁷⁶⁻⁷⁸. La otra forma, con mejor pronóstico, parece surgir de una célula B de memoria post-CG, ya que los genes IgVH están mutados ⁷⁶⁻⁷⁸. Curiosamente, ambas formas muestran características comunes como son la presencia de anticuerpos (Ac) auto-reactivos o poli-reactivos ⁷⁹, marcadores de superficie parecidos ⁸⁰ y un perfil de expresión génica muy similar con pocos genes o proteínas diferenciando ambas formas de LLC, entre ellos ZAP-70 ⁷⁶. Para muchos autores, todas estas características indican que ambos tipos de LLC surgen por alteraciones de un proceso reeducativo común enfocado a evitar autoreactividad a través de mecanismos de tolerancia central o periférica. Estos mecanismos incluyen, entre otros, la edición del receptor de la célula B (BCR) y la expresión de CD5 ^{77,78}. Un rasgo indicativo de que las células de LLC han sido sometidas a procesos de anergia y edición del BCR es la reducción de los niveles de superficie de IgM ^{81,82}. Cuando la edición del BCR no es eficaz, como se cree que ocurre en la LLC,

las células B auto-reactivas aumentan la expresión de CD5 lo que aumenta el umbral de activación del BCR, favoreciendo el estado de anergia ^{83,84}. Sin embargo, y a pesar de que las células de LLC expresan CD5, esta molécula no inhibe adecuadamente la señalización mediada por el BCR y puede, además, promover la secreción autocrina de IL-10 que protege de la apoptosis a través de la expresión de la proteína antiapoptótica Bcl-2 ^{85,86}. Además, Bcl-2 contribuye, junto con las vías de TRAF (factor asociado al receptor del factor de crecimiento tumoral TNF), al desarrollo de esta leucemia ^{87,88}.

3.4. LLC y microambiente tumoral

En MO y OLS, las células de LLC establecen interacciones moleculares complejas con células circundantes, factores solubles y matriz extracelular (MEC), que en conjunto constituyen el MAT ⁸⁹. Estas interacciones favorecen la supervivencia y proliferación de las células de LLC y confieren resistencia a fármacos, pudiendo ser responsables de la enfermedad mínima residual (EMR) existente tras el uso de las terapias convencionales ⁹⁰. Como se aprecia en la **Figura 5**, algunos de los principales actores de este MAT son las células estromales mesenquimales (BMSC) ^{91,92}, las células NLC (o células tipo nodriza) derivadas de monocitos ⁹³, las células T ^{94,95} y las DC foliculares (FDC) ⁹⁶. Algunos de estos tipos celulares, como las células T, son reclutados por las células de LLC mediante la secreción de los factores solubles quimioatrayentes CCL3, CCL4 y CCL22 ^{94,95}. Así, se forman los centros de proliferación (o pseudofolículos) característicos de la enfermedad ⁹⁷ en los que existe una pequeña proporción (0,1-1%) de células de LLC muy prolíferas que proporciona un recambio de aproximadamente un 2% de células nuevas cada día ⁹⁸. Dichas células presentan mayor tamaño y expresan marcadores de proliferación como Ki67, CD24, CD43 y CD38 ⁹⁹. Cuanto mayor es la tasa de proliferación, más agresiva es la enfermedad ^{69,98}. Cuando la célula de LLC migra a SP no se divide; o entra en apoptosis o vuelve de nuevo a los centros de proliferación de manera que está continuamente circulando entre un estado proliferativo en el tejido y un estado quiescente en la periferia ⁹⁷.

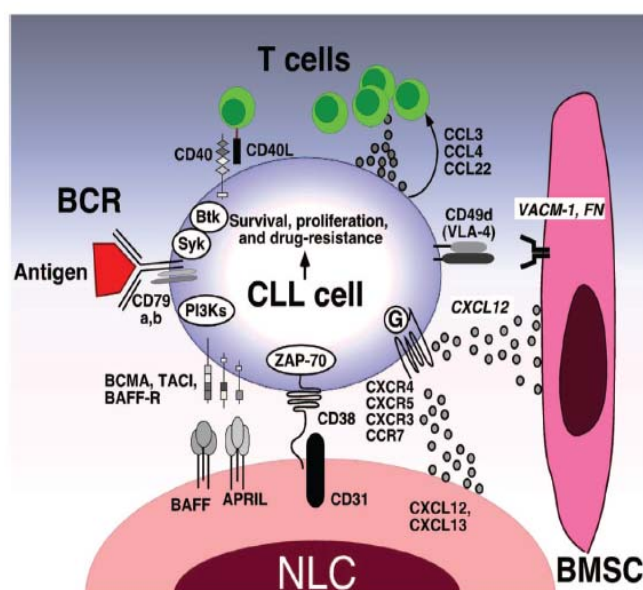


Figura 5. Interacciones moleculares en el microambiente de la LLC. Se muestran algunas interacciones entre las células de LLC y células estromales (BMSC), células tipo nodriza (NLC) o células linfoides que son consideradas importantes para el *homing*, la retención en tejido, la supervivencia o la proliferación de células de LLC. La sinapsis entre las células de LLC y NLC o BMSC se mantiene principalmente por CKR y moléculas de adhesión. En los centros de proliferación, los autoantígenos o Ag del MAT se consideran factores clave de la activación y expansión de células de LLC por activación de BCR y sus quinasas asociadas, y otras moléculas coestimuladoras entre las que destacan aquellas moléculas activadoras de la proliferación como los pares CD40/CD40L y CD38/CD31, el factor de activación de células B de la familia del TNF (BAFF) o el ligando inductor de proliferación (APRIL). Extraído de Burger *et al* (2011) ⁸⁹.

3.5. Genoma de la LLC: anomalías citogenéticas y oncogenes

Algunos de los mecanismos que se han propuesto para explicar el origen del clon de células de LLC, como la edición del BCR, producen roturas en el DNA de doble cadena, que pueden generar tanto translocaciones como deleciones ⁷⁷. El genoma de la LLC es de los menos complejos de entre las neoplasias hematológicas: carece de translocaciones cromosómicas y la adquisición de deleciones en 13q, 11q y 17p es muy homogénea ¹⁰⁰⁻¹⁰². Dichas deleciones están presentes en el 80% de los pacientes, no son estables a lo largo de la enfermedad y son consideradas el predictor más significativo de progresión de la enfermedad ^{100,101} (**Tabla 3**).

	Diagnóstico	QR	SR
* <i>Del13q14</i>	50	50	20
*+12	15	15	15
* <i>Del11q (ATM)</i>	15	25	12
* <i>Del17p (TP53)</i>	5-10	40	60
** <i>BIRC3</i>	4	25	0
** <i>SF3B1</i>	5-10	25	5
** <i>NOTCH-1</i>	10	25	30

Tabla 3. Lesiones genéticas asociadas a la LLC en diferentes fases de la enfermedad. La frecuencia de las lesiones genéticas (%) se muestra para la LLC en el momento del diagnóstico y para dos tipos de progresión: hacia quimioresistencia (QR) sin evidencia de transformación histológica, y hacia transformación histológica a Síndrome de Richter (SR). Ambos tipos de progresiones siguen diferentes vías moleculares en términos de tipo y frecuencia de las lesiones genéticas. Las lesiones que se dan en el momento del diagnóstico pero que no se encuentran enriquecidas en las progresiones se indican en rojo y gris. *, alteraciones cromosómicas; **, mutaciones génicas. Modificado de Gaidano *et al* (2012) ⁷⁴.

La deleción 13q14.3 (*del13q*) es la alteración más frecuente (50-60% de los casos) ^{100,101}. Se considera un evento temprano de la enfermedad ya que muy a menudo se presenta como una lesión única ⁷⁴. La supervivencia total para *del13q* es mayor que la descrita para una citogenética normal ¹⁰⁰. Dos genes de dos micro RNAs (miRNA), mir-15-a y mir-16-1-a están ubicados en esta región ¹⁰³ y ambos regulan negativamente la expresión de la proteína antiapoptótica Bcl-2, por lo que su ausencia permite a la célula de LLC sobrevivir por mecanismos dependientes de Bcl-2 ¹⁰⁴.

La deleción 11q22-23 (*del11q*) es la segunda deleción más común en LLC (15-25% de los pacientes) ^{100,101}. Se asocia con un progreso más rápido de la enfermedad, mayor extensión de la linfadenopatía, menor supervivencia, inicio temprano de terapia, quimioresistencia y mayor riesgo de evolución clonal ^{100,102,105,106}. Esta deleción afecta al gen mutado de la ataxia telangiectasia (*ATM*), un elemento central en la vía de daño del DNA y de la regulación del ciclo celular, cuya deficiencia causa inestabilidad genómica ¹⁰⁷.

En aproximadamente un 5-10% de los pacientes de LLC al diagnóstico y aun no tratados se halla la deleción 17p13 (*del17p*) ¹⁰⁰. Ésta afecta al gen supresor de tumores *TP53*, cuyo producto es la proteína supresora de tumores P53, un factor de transcripción que se activa cuando se produce un daño en el DNA, reparándolo o induciendo apoptosis o paradas en el ciclo celular ⁷⁴. Muchos casos (>80%) de LLC con *del17p* monoalélica muestran, además, el segundo alelo de *TP53* inactivado por mutación puntual ^{108,109}. Los casos de LLC sin deleción, pero con la mutación en *TP53* son menos

frecuentes ¹¹⁰, sin embargo, ambas alteraciones son un importante predictor de quimioresistencia y se asocian con un tiempo corto de progresión de la enfermedad y una supervivencia reducida ¹⁰⁸⁻¹¹³.

Otra alteración frecuente es la trisomía del cromosoma 12 (15-20% de los casos). Se cree que altera la dosis génica de uno o más proto-oncogenes ⁷⁴, aunque los genes en concreto se desconocen. Tampoco se asocia con peor pronóstico, estadio de la enfermedad o quimioresistencia.

3.6. *Terapia en LLC*

Durante más de 50 años, la terapia basada en agentes alquilantes como clorambucilo o ciclofosfamida fue el pilar del tratamiento de la LLC. La posterior introducción de los análogos del nucleósido purina (PNA), por ejemplo fludarabina, cladribina o pentostatina, significó un importante avance con mayores tasas de respuestas totales y completas en monoterapia o en combinación con agentes alquilantes ¹¹⁴. Pero el verdadero cambio en el tratamiento de esta dolencia se produjo con la llegada de dos anticuerpos monoclonales (AcMo): rituximab, dirigido contra el Ag de superficie CD20, y alemtuzumab, dirigido contra el Ag CD52. El uso de AcMo en combinación con PNA ha aumentado tanto los periodos libres de enfermedad como la supervivencia total ¹¹⁵. Sin embargo, dichos resultados dependen del perfil citogenético del paciente. Por ejemplo, el tratamiento de referencia, la combinación FCR (fludarabina, ciclofosfamida y rituximab), consigue mejores resultados en pacientes no tratados y en estadio A o B de Binet, no siendo estas mejorías tan notables en pacientes con *del17p* o en estadios más avanzados ^{115,116}. Por último, y en contra de lo que ocurre con otros linfomas no Hodgkin (LNH), el papel del trasplante de precursores hematopoyéticos (HSCT) como práctica clínica regular en LLC sigue indefinida. Se ha usado principalmente en pacientes con LLC de alto riesgo o aquellos no respondedores a las terapias estándar y que eran idóneos para el procedimiento ¹¹⁷. En la actualidad hay diferentes aproximaciones terapéuticas bien en fase de desarrollo o en ensayos clínicos con resultados prometedores. Cabe destacar a los inhibidores de la señalización del BCR, como las moléculas Ibrutinib (específica de la enzima tirosina quinasa de Bruton, Btk) o idelalisib (específica de la subunidad catalítica p110δ de la PI3K) ¹¹⁸.

3.7. *Pacientes con necesidades terapéuticas urgentes*

A pesar de los tratamientos arriba citados, la LLC es una enfermedad que sigue sin cura y en la que todos los pacientes que necesitan terapia están destinados a la recidiva ⁷⁴. Los pacientes con función P53 anormal, con enfermedad refractaria a PNA, transformación a SR o con un débil estado físico son los que presentan necesidades terapéuticas más urgentes ¹¹⁷. Los grupos mayoritarios son los dos primeros, que además comparten el peor pronóstico y los mayores problemas clínicos.

El grupo de pacientes con alteraciones de *TP53* (*del17p* y mutación del gen) presenta periodos libres de enfermedad y la supervivencia total en torno a los 2-3 años desde el tratamiento en primera línea (**Figura 6**) ^{100,108,110,112,115,119}. Aunque al diagnóstico este grupo representa en torno al 7-10% del total, la proporción aumenta durante el curso de la enfermedad, alcanzando valores del 25% a los 5 años del diagnóstico ^{102,120}. Esta proporción también aumenta bajo la presión selectiva de

terapias conteniendo PNA, que llega, en este caso, a valores en torno al 20% en la recaída y del 40-60% en la LLC refractaria a fludarabina^{102,120,121}. Es tal la relevancia de las alteraciones de *TP53* que, en la actualidad, las guías de manejo de la LLC sólo consideran el valor pronóstico de éstas para la estratificación de terapias. Su presencia es el único caso, hasta la fecha, que condiciona el uso de una terapia específica en esta leucemia. Para tratar a estos pacientes se recomiendan regímenes alternativos que eviten la quimioresistencia inducida por la alteración en *TP53*, entre ellos, AcMo, corticoesteroides, lenalidomida o inhibidores de las quinasas del BCR¹²².

La enfermedad refractaria a fludarabina (LLC-RF) se define como aquella que no responde a los regímenes que contienen PNA o que recae dentro de los 6 meses de tratamiento con un régimen que contenga fludarabina¹²³. A pesar de que el uso de FCR ha conseguido reducir la probabilidad de enfermedad refractaria con respecto a regímenes a base de FC, aproximadamente un tercio de los pacientes tiene una resistencia al tratamiento significativa, que correlaciona con una baja supervivencia total¹²⁴. Hasta un 40-60% del total de casos de LLC-RF presentan *del17p*, por ello no sorprende que este grupo de pacientes haya respondido a aproximaciones terapéuticas similares a las usadas en pacientes con alteración de *TP53*^{125,126}.

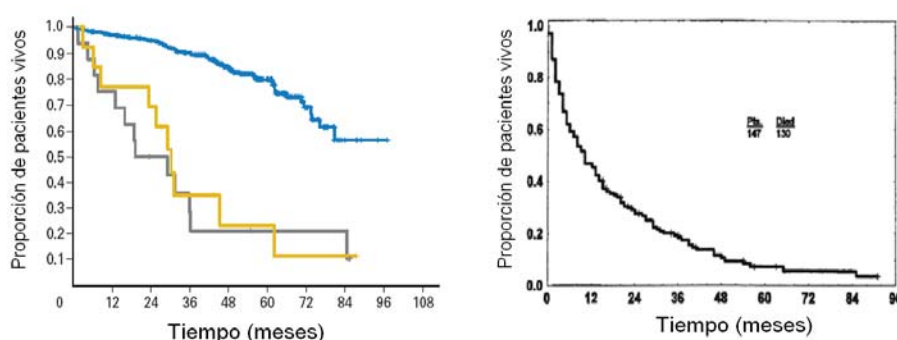


Figura 6. Supervivencia total (OS) mediana de subgrupos genéticos en el ensayo CLL4 (F vs FC) del grupo alemán de estudio de la LLC (CLLSG). Tras el tratamiento en primera línea con regímenes basados en fludarabina, la LLC con mutación en *TP53* y sin *del17p* (amarillo) muestra resultados similares que la LLC con la delección (gris). En azul se muestra la OS del resto de pacientes. Modificado de Gonzalez *et al* (2011)¹¹³. La OS mediana de la LLC refractaria a fludarabina es de 10 meses. Los pacientes que recaen tras el tratamiento con FC o FCR tienen pobres resultados clínicos. OS desde el comienzo de la 2ª línea de tratamiento de aquellos pacientes inicialmente tratados en el ensayo CLL8 (FC vs FCR). Modificado de Keating *et al* (1998)¹²⁷.

3.8. Papel de *CCR7* en LLC

En los últimos años se ha desvelado un papel pro-tumoral de *CCR7* en la biología de la LLC, al favorecer procesos migratorios, proliferativos y de supervivencia. En el año 2004, López-Giral *et al* demostraron que las neoplasias linfoides de linaje B infiltrantes de OLS, como la LLC, expresaban mayores niveles de *CCR7* que las neoplasias B no infiltrantes o que los linfocitos B normales⁵⁴. Además, como se aprecia en la **Figura 7**, se constató que la capacidad migratoria en gradientes de CCL19 o CCL21 se relacionaba con la presencia de linfadenopatía clínica⁵⁴. Otros grupos, por su parte, correlacionaron los niveles de expresión del receptor con el estadio de la enfermedad¹²⁸, o

describieron que el receptor mediaba migración a través de endotelio gracias a la secreción de metaloproteinasa de la matriz 9 (MMP-9) vía ERK1/2 ¹²⁹ y en colaboración con la molécula de adhesión $\alpha 4\beta 1$ ^{130,131}. Posteriormente, se ha llegado a sugerir que la quimiotaxis mediada por CCR7 correlaciona positivamente con la expresión del factor pronóstico ZAP-70 ^{132,133} explicando en parte por qué este subtipo de LLC es más agresiva, aunque esta correlación no está del todo clara ⁵⁴. Además, CCR7 también participa en supervivencia de la LLC de forma aislada ¹³⁴ o mediante señalización sinérgica con otros CKR como CXCR5 ¹³⁵.

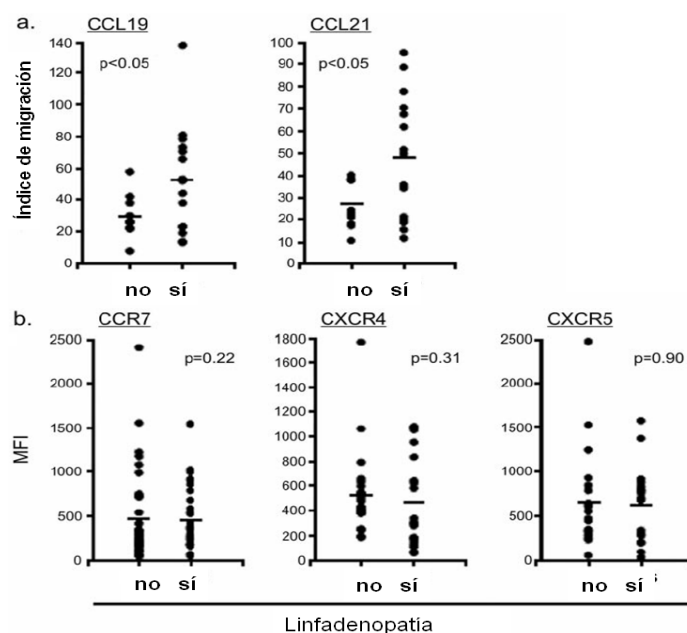


Figura 7. Los índices de migración a CCL19/CCL21 correlacionan con la presencia de linfadenopatía clínica. A) Índices de migración en respuesta a CCL19 o CCL21 medidos en una cohorte de 25 pacientes que incluía 15 casos con linfadenopatía clínica y 10 casos sin ella. B) La densidad de CCR7, CXCR4 y CXCR5 en superficie no se asocia con la presencia de linfadenopatía clínica en una cohorte de 70 pacientes formada por 33 casos con linfadenopatías y 37 casos sin ellas. Extraído de López-Giral *et al* (2004) ⁵⁴.

3.9. Modelos in vivo de LLC

Las células primarias y las pocas líneas celulares existentes son la base de la investigación *in vitro* de la LLC. Sin embargo, para el estudio de nuevos tratamientos, los modelos animales son esenciales. Desafortunadamente, ninguno de los modelos *in vivo* disponibles hasta la fecha reproducen el número y la complejidad de las lesiones genéticas observadas en LLC ¹³⁶. Los modelos singénicos New Zealand Black y New Zealand White ¹³⁶, o el modelo transgénico para TCL-1 (proteína 1 de leucemias y linfomas de célula T) ¹³⁷, no presentan lesiones genéticas características de la enfermedad. Más recientemente se han desarrollado nuevas cepas de ratones transgénicos que mimetizan la *del13q* ¹³⁸ y que parecen recapitular la historia natural de la LLC. Sin embargo, todos estos modelos no son muy atractivos para la investigación clínica ya que en todos se produce un desarrollo tardío de la enfermedad y la penetrancia es baja. Por otro lado, estos y otros modelos transgénicos ^{87,88} no son útiles para el estudio de dianas presentes en humanos y ausentes en ratón. Por

tanto, los modelos de xenoinjerto podrían resultar una herramienta más ventajosa para el test de nuevas drogas *in vivo*. A pesar de que numerosos estudios han establecido relaciones complejas entre factores clínicos y moleculares con el éxito del trasplante ¹³⁶, es difícil establecer modelos capaces de garantizar la expansión de células de LLC primarias o líneas de LLC y, en caso de conseguir injerto, no se produce un patrón de diseminación de la enfermedad similar al observado en humanos.

4. Leucemia prolinfocítica T (LPLT)

4.1. Características clínicas y epidemiología

La LPLT es una leucemia agresiva de linaje T caracterizada por la rápida proliferación de prolinfocitos postímicos con fenotipo de célula madura. Afecta a SP, MO, GL, hígado, bazo y piel ^{139,140}. La LPLT es una enfermedad rara que representa un 2% de los casos de leucemias linfocíticas maduras en adultos y el 3% del total de las neoplasias de linaje T ¹⁴⁰; la edad media al diagnóstico es de 65 años y la supervivencia media normalmente de menos de un año ¹⁴¹.

4.2. Diagnóstico

La mayoría de los pacientes presentan hepatoesplenomegalia y linfadenopatía generalizada. La infiltración en piel se da en un 20% de los pacientes, y en una minoría se pueden encontrar efusiones séricas y afectación del SNC ^{140,141}. La anemia y trombocitopenia son comunes y el conteo linfocitario es habitualmente mayor de $100 \times 10^9/L$, siendo un aspecto distintivo los tiempos de duplicación bajos ^{140,141}. Los prolinfocitos T no expresan Tdt ni el marcador timocortical CD1a mientras que sí expresan CD2, CD3, CD5 y CD7 de forma intensa. El Ag CD52 generalmente se expresa en alta densidad y puede ser usado como diana terapéutica ¹⁴¹. Los marcadores inmunofenotípicos más específicos de la LPLT son la expresión de las proteínas CD26 y TCL-1 ¹⁴¹.

4.3. Factores pronósticos

Hay muy poca información relacionada con factores pronósticos en esta enfermedad. Hasta la fecha, se ha considerado que aquellos pacientes que no responden a alemtuzumab son los que tienen peor pronóstico (**Figura 8**), entre ellos, los pacientes con infiltración de SNC o hígado ¹⁴⁰. Sin embargo, están empezando a ganar fuerza estudios recientes que indican que, al diagnóstico, el conteo linfocitario elevado, los tiempos cortos de duplicación linfocitaria, la edad y elevados niveles de expresión de las proteínas TCL-1 y de AKT pueden ser considerados factores pronósticos adversos ^{141,142}.

4.4. Etiopatogenia

Para algunos autores, la coexpresión distintiva de CD4 y CD8 junto con la débil expresión de CD3 y la fuerte expresión de CD7 sugieren que la LPLT se corresponde con un estadio de diferenciación intermedio entre el timocito cortical y la célula T madura circulante ¹⁴⁰.

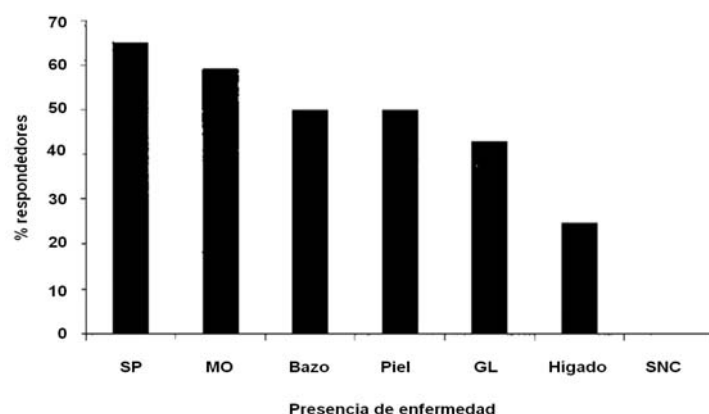


Figura 8. Proporción de pacientes de LPLT que responden a alemtuzumab en función del órgano afectado por la enfermedad. Extraído de Dearden *et al* (2011) ¹⁴⁵.

4.5. Genoma de la LPLT: alteraciones citogenéticas y oncogenes

Las alteraciones más habituales afectan a los cromosomas 14, 11, 8 y X, aunque las anomalías en el cromosoma 17 no son infrecuentes ¹⁴⁴. La inversión *inv*(14)(q11;q32) o la traslocación *t*(14;14)(q11;q32) generan yuxtaposición de los genes del receptor de la célula T o TCR (14q11) con el proto-oncogen *TCL-1* (14q32) ^{145,146}. La *t*(X;14)(q28;q11), por su parte, resulta en el reordenamiento del gen *MTCP-1* (gen 1 de la proliferación de células T maduras) con los genes del TCR ¹⁴⁷. La sobreexpresión del gen *TCL-1* o del gen *MTCP-1* tiene propiedades oncogénicas ^{148,149}.

4.6. Terapia en LPLT y en pacientes con necesidades terapéuticas urgentes

La LPLT responde muy mal a la quimioterapia convencional lo que resulta en una supervivencia total mediana de 7 meses ¹⁴⁰. Las mejores respuestas terapéuticas se han descrito con el uso intravenoso del AcMo alemtuzumab (anti-CD52), que se ha convertido en el tratamiento de elección en primera línea ¹⁴⁰. Usado en monoterapia ^{143,150,151}, o bien en combinación con PNA ^{152,153}, ha extendido la supervivencia a unos 24 meses y si se consolida mediante HSCT la supervivencia aumenta a 48 meses ¹⁵⁴. Aun así, no todos los pacientes son candidatos a HSCT y el tratamiento con alemtuzumab no es curativo, las respuestas son transitorias y la progresión de la enfermedad es inevitable en todos los casos ^{140,143}. En este escenario, aquellos pacientes con afectación del SNC, los refractarios a alemtuzumab o los que no son candidatos para el uso del AcMo por baja o nula expresión de CD52 son aquellos que presentan necesidades terapéuticas de forma más urgente.

4.7. Papel de CCR7 en LPLT

Hasta ahora, no hay evidencias experimentales publicadas que demuestren la presencia del receptor CCR7 o un papel funcional del mismo en la patogénesis de la LPLT. Sin embargo, la expresión de CCR7 se ha asociado con la biología y la diseminación a GL de otras enfermedades de célula T como la leucemia/linfoma de células T del adulto (LTA) ⁵², la micosis fungoide ⁵³ o las neoplasias de células T inmaduras, donde CCR7 es, además, un importante mediador de entrada en el

SNC⁵⁰. Por ello, y dado que la LPLT comparte características clínicas con la LTA y con la micosis fungoide, es probable que el receptor también se exprese en esta patología.

4.8. Modelos in vivo de LPLT

En el caso de la LPLT, la sobreexpresión de TCL-1 o MTCP-1 tiene propiedades oncogénicas y ambas sobreexpresiones generan un tipo de leucemia de célula T (CD4-/CD8+) en ratones muy parecida a la LPLT^{148,149}. Sin embargo, y como ocurre en LLC, la baja penetrancia, los largos tiempos de desarrollo de la enfermedad y la dificultad para xenotrasplantar células primarias son factores limitantes a la hora de estudiar posibles agentes terapéuticos en esta enfermedad.

5. Cáncer de mama (CM)

5.1. Características clínicas y epidemiología

El CM es el tumor maligno más frecuente en la población femenina, tanto en países desarrollados como en aquellos en vías de desarrollo, y representa entre el 23-28% de todos los tumores incidentes¹⁵⁵. Es la primera causa de muerte por cáncer en mujeres, con una tasa de mortalidad de 28,2 por 100.000, lo que representa el 18,4% del total de muertes por cáncer en mujeres¹⁵⁵. La supervivencia, recidiva, tiempo hasta la recidiva y fracaso al tratamiento se correlacionan con el número de ganglios axilares positivos. La presencia de algún ganglio positivo disminuye la supervivencia del 76 al 25%¹⁵⁶.

5.2. Terapia en CM y en pacientes con necesidades terapéuticas urgentes

En CM, las opciones terapéuticas actuales incluyen cirugía, quimioterapia, radioterapia, y las terapias sistémicas hormonales y con agentes biológicos como los AcMo (**Tabla 4**). A pesar de que las mejoras terapéuticas han aumentado las tasas de supervivencia, se requieren nuevas estrategias dirigidas contra la formación y/o eliminación de metástasis, que son la principal causa de muerte en CM¹⁵⁵. Las pacientes con afectación de GL axilares (estadio III), metástasis (estadio IV) y/o aquellas pacientes denominadas “triples negativo” para un conjunto de tres receptores, son las pacientes con peor pronóstico¹⁵⁷. Las pacientes triple negativo, aquellas con más frecuencia de metástasis y un progreso más rápido de la enfermedad, no muestran expresión de receptores estrogénicos, receptores de progesterona o del receptor HER-2/neu (o HER 2), lo que anula la posibilidad de ser tratadas con terapia hormonal o con el AcMo trastuzumab, dirigido contra HER-2¹⁵⁷.

5.3. Papel de CCR7 en CM

La expresión de CCR7 en células de CM se asocia con metástasis a GL^{55,56,63} y mal pronóstico¹⁵⁸. Lo mismo ocurre con la expresión de los ligandos, siendo mayor en pacientes que presentan metástasis en GL y pronóstico adverso¹⁵⁹. La señalización mediada por CCR7 promueve quimiotaxis e invasión hacia gradientes naturales de CCL21⁵⁵ o a través de gradientes transcelulares

autocrinos generados por la propia célula tumoral ⁵⁸ con la participación de integrinas $\beta 1$ ¹⁶⁰. En CM, el receptor además está asociado a tumorigénesis ¹⁶¹, linfangiogénesis ¹⁶², transición epitelio-mesénquima ¹⁶³, proliferación, supervivencia ¹⁶⁴, y con la generación de un MAT tolerogénico ⁶¹.

6. Inmunoterapia del cáncer

Desde mediados del siglo pasado se sabe que el sistema inmunológico es capaz de reconocer y eliminar células tumorales. Sin embargo, estas células son capaces de evadir y/o suprimir las respuestas inmunitarias del paciente, manteniéndose y diseminándose ⁵. La modalidad de tratamiento que modula la respuesta inmunitaria del propio paciente para favorecer la erradicación de las células tumorales es la inmunoterapia (IT) del cáncer, una de las herramientas terapéuticas más importantes de la medicina actual y considerada ya como la cuarta modalidad de terapia antitumoral (junto con la cirugía, la radioterapia y la quimioterapia) ¹⁶⁵. La IT ofrece la ventaja de reducir el daño tisular colateral gracias a la especificidad inherente del sistema inmunológico. Además, el tráfico sistémico de las células inmunitarias también ayuda en el tratamiento de lesiones metastásicas e inoperables. Pero quizás, lo más destacado de la IT es la capacidad para generar memoria inmunológica tras una respuesta antitumoral robusta que puede prevenir la recurrencia de tumores y puede llevar a una curación completa y duradera ¹⁶⁵. Para ello, las armas que ofrece la IT contra el cáncer son diversas y pueden clasificarse, a grandes rasgos, en estimuladoras del sistema inmunológico o inhibidoras de mecanismos tumorales y de la tolerancia al tumor ⁵, aunque la línea que separa a ambas es muy fina.

6.1. Inmunoterapia del cáncer basada en anticuerpos monoclonales (AcMo)

Una aproximación que ha revolucionado el tratamiento del cáncer en las últimas dos décadas implica el uso de AcMo dirigidos contra Ag tumorales específicos o contra receptores y ligandos implicados en la proliferación y supervivencia de la célula tumoral. Desde que en 1975 Köhler y Milstein desarrollaran el método para la producción y aislamiento de AcMo a partir de células de hibridoma ¹⁶⁶, y gracias a que ambos científicos no patentaron su método, el uso de su tecnología ha permitido generar terapias en múltiples enfermedades y ofrece nuevas dianas potenciales y aplicaciones. En 2011 había más de 300 AcMo terapéuticos en ensayos preclínicos o clínicos ¹⁶⁷ y cerca de 40 AcMo (todos ellos IgG) y proteínas de fusión a Fc ya han sido aprobados por la FDA (*USA Federal Drug Agency*) o la EMA (*European Medicines Agency*) con fines terapéuticos. De ellos, más de la mitad se destinan al tratamiento de la enfermedad tumoral (**Tabla 4**).

6.1.1. Aspectos estructurales y funcionales de los AcMo

Los Ac son proteínas globulares pertenecientes a la familia de las Ig ^{168,169}. La estructura básica de un Ac consta de dos cadenas proteicas pesadas (H) de unos 50 kD, iguales entre sí y unidas por puentes disulfuro, y dos cadenas ligeras (L) de unos 23 kD, igualmente idénticas entre sí, que se

Nombre genérico (nombre comercial)	Formato	Diana	Indicaciones	Primera aprobación (EU/EEUU)
rituximab (<i>Rituxan / MabThera</i>)	IgG1 (q)	CD20	LNH	1998/1997
trastuzumab (<i>Herceptin</i>)	IgG1 (hz)	HER-2	CM	2000/1998
gemtuzumab ozogamicin (<i>Mylotarg</i>)	IgG4 (hz)	CD33	LMA	NA/2000#
alemtuzumab (<i>Campath-1H / Lemtrada</i>)	IgG1(hz)	CD52	LLC	2001#/2001#
ibritumomab tiuxetan (<i>Zevalin</i>)	IgG1 (m)	CD20	LNH	2004/2002
tositumomab-1131 (<i>Bexxar</i>)	IgG2a (m)	CD20	LNH	NA/2003#
cetuximab (<i>Erbix</i>)	IgG1(q)	EGFR	CC	2004/2004
bevacizumab (<i>Avastin</i>)	IgG1 (hz)	VEGFa	CC	2005/2004
panitumumab (<i>Vectibix</i>)	IgG2 (hz)	EGFR	CC	2007/2006
catomaxomab (<i>Removab</i>)	bis (r/m)	EpCAM/CD3	AM	2009/NA
ofatumumab (<i>Arzerra</i>)	IgG1 (h)	CD20	LLC	2010/2009
ipilimumab (<i>Yervoy</i>)	IgG1 (h)	CTLA-4	M	2011/2011
brentuximab vedotin (<i>Adcetris</i>)	IgG1 (q)	CD30	LH, LA	2012/2011
pertuzumab (<i>Perjeta</i>)	IgG1(hz)	HER-2	CM	2013/2012
ado-trastuzumab emtansine (<i>Kadcyla</i>)	IgG1 (hz)	HER-2	CM	2013/2013
obinutuzumab (<i>Gazyva</i>)	IgG1 (hz)	CD20	LLC	2014/2013
ramucirumab (<i>Cyramza</i>)	IgG1 (h)	VEGFR2	CaG	2014/2014
pembrolizumab (<i>Keytruda</i>)	IgG4 (hz)	PD-1	M	P/2014
blinatumomab (<i>Blincyto</i>)	Bis (m/m)	CD3/CD9	LAL-B	ER/2014
nivolumab (<i>Opdivo</i>)	IgG4 (h)	PD-1	M, NSCLC	P/ 2014
dinutuximab (<i>Unituxin</i>)	IgG1 (q)	GD2	NB	P/2015
necitumumab (pendiente)	IgG1 (h)	EGFR	NSCLC	ER/ER
mogalizumab (<i>Poteligeo</i>)	IgG1 (hz)	CCR4	LNH-T	Japón 2012*

Tabla 4. AcMo terapéuticos aprobados (o en revisión) para el tratamiento del cáncer en EU o EEUU. Los AcMo se designan como ratón (m), rata (r), quiméricos (q), humanizados (hz), humanos (h) y biespecíficos (bis). Se muestran algunas indicaciones para los que han sido aprobados. LLC, leucemia linfocítica crónica; LNH, linfoma no Hodgkin; CM, cáncer de mama; LMA, leucemia mieloide aguda; CC, cáncer colorrectal; AM, ascitis maligna; M, melanoma; LH, linfoma de Hodgkin; LA, linfoma anaplásico; CaG, cáncer gástrico; LAL, leucemia linfoblástica; NSCLC, cáncer de célula no pequeña de pulmón; NB, neuroblastoma; EGFR, receptor del factor de crecimiento epidérmico; HER-1, receptor del factor de crecimiento epidérmico humano 1 o EGFR1; HER-2, receptor del factor de crecimiento epidérmico humano 2 o EGFR2; VEGFa, factor de crecimiento endotelial vascular A; EPCAM, molécula de adhesión de células epiteliales; CTLA-4, antígeno 4 de linfocitos T citotóxicos; VEGFR, receptor del factor de crecimiento endotelial vascular A; PD-1, receptor 1 de muerte celular programada; GD2, disialogangliósido de superficie 2; CCR4, receptor 4 de CK de clase C-C; NA, no aprobado; #, retirado del mercado o de su primera indicación; P, pendiente de decisión; ER, en revisión. *, aprobado por otras agencias reguladoras. Fuente: www.antibodysociety.org y www.ClinicalTrials.gov.

unen individualmente a cada una de las cadenas H por interacciones covalentes y no covalentes^{168,169} (**Figura 9**). Los primeros 100 residuos de cada cadena son virtualmente distintos en cada molécula de Ac (región variable o V), mientras que el resto de la cadena es idéntica en cada Ac de una determinada clase (región constante o C)^{168,169}.

Los Ac humanos se agrupan en 5 clases o isotipos en base a la secuencia de la región C de su cadena pesada: IgM, IgD, IgG, IgE e IgA. La clase IgG es la más frecuentemente usada para IT del cáncer y ésta, a su vez, se divide en 4 subclases: IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4¹⁶⁹. Desde un punto de vista funcional, en los Ac de tipo IgG se distinguen dos regiones que determinan el papel biológico de este

tipo de Ac y que explican su gran utilidad en inmunoterapia (**Figura 9**): el fragmento o región de unión a Ag (Fab) y el fragmento o región cristalizante o constante (Fc) ^{168,169}. Todas las funciones inmunitarias conocidas de la IgG están determinadas por la interacción de la región Fab con el Ag y de la región Fc con otras tres clases de parejas naturales de unión: moléculas del complemento ¹⁷⁰, los receptores para Fc de IgG (FcγRs) ¹⁷¹ y el receptor de Fc neonatal (FcRn) ¹⁷². La zona de unión al Ag está formada por tres segmentos peptídicos no colineales pertenecientes al dominio VH y tres al dominio VL, que se yuxtaponen para formar una superficie o cavidad (parátipo) donde se aloja la región del Ag reconocida por el Ac (epítipo). Los segmentos que lo forman reciben el nombre de regiones hipervariables o regiones determinantes de complementariedad (CDR), que son las que confieren especificidad antigénica ^{168,169}. La región Fc es la que activa las funciones efectoras del sistema inmunológico. En los Ac de tipo IgG la región Fc está compuesta por dos fragmentos protéicos idénticos pertenecientes al segundo y tercer dominio constante de las dos cadenas pesadas ¹⁶⁷. En el segundo dominio, la región Fc presenta un sitio de N-glicosilación altamente conservado esencial para activar funciones efectoras ¹⁷³.

6.1.2. Receptores de la región Fc de las inmunoglobulinas

Los receptores de la región Fc de las Ig (FcR) son un grupo de glicoproteínas pertenecientes a la superfamilia de las Ig. Estos receptores pueden ser de la clase FcαR, FcγR y FcεR, siendo los FcγRs los que se expresan mayoritariamente en los leucocitos y la clase más relevante para la función de los Ac terapéuticos ¹⁶⁹. Los FcγR, a su vez, se dividen en tres tipos: FcγRI (CD64), FcγRII (CD32) y FcγRIII(CD16) ¹⁷¹. En general, los FcγRI se consideran receptores de alta afinidad que unen tanto IgG monoméricas como inmunocomplejos, mientras que las afinidades para los FcγRII y los FcγRIII para IgG son, respectivamente, media y baja ¹⁷¹.

Los FcγR pueden transducir señales activadoras a través de dominios activables por tirosinas o ITAM o pueden transmitir señales inhibitoras a través de dominios inhibidos por tirosina o ITIM. El principal FcγR inhibitor es la cadena sencilla FcγRIIB (CD32B) ¹⁷¹. Por el contrario, la mayoría de las señales estimuladoras dependientes de Fc son transducidas por FcγRI y FcγRIIIA, que requieren de una cadena γ accesoria con ITAM para iniciar la transducción ¹⁷¹. Los FcγR activadores median respuestas como la ADCC (citotoxicidad celular dependiente de Ac), la ADCP (fagocitosis celular dependiente de Ac), la endocitosis de inmunocomplejos seguidas de presentación antigénica y liberación de citocinas o mediadores proinflamatorios ¹⁶⁹.

Otro tipo de receptor de Fc es el FcRn, estructuralmente diferente de los FcγR y relacionado con moléculas de MHC de clase I. Éste se une tanto a albúmina como a Ac tipo IgG aunque no promueve ADCC ni ADCP ^{167,172}. Sus funciones más conocidas son la transferencia pasiva de inmunidad humoral de la madre al feto y evitar la degradación de la IgG, contribuyendo a la larga vida media sérica de esta clase ¹⁷².

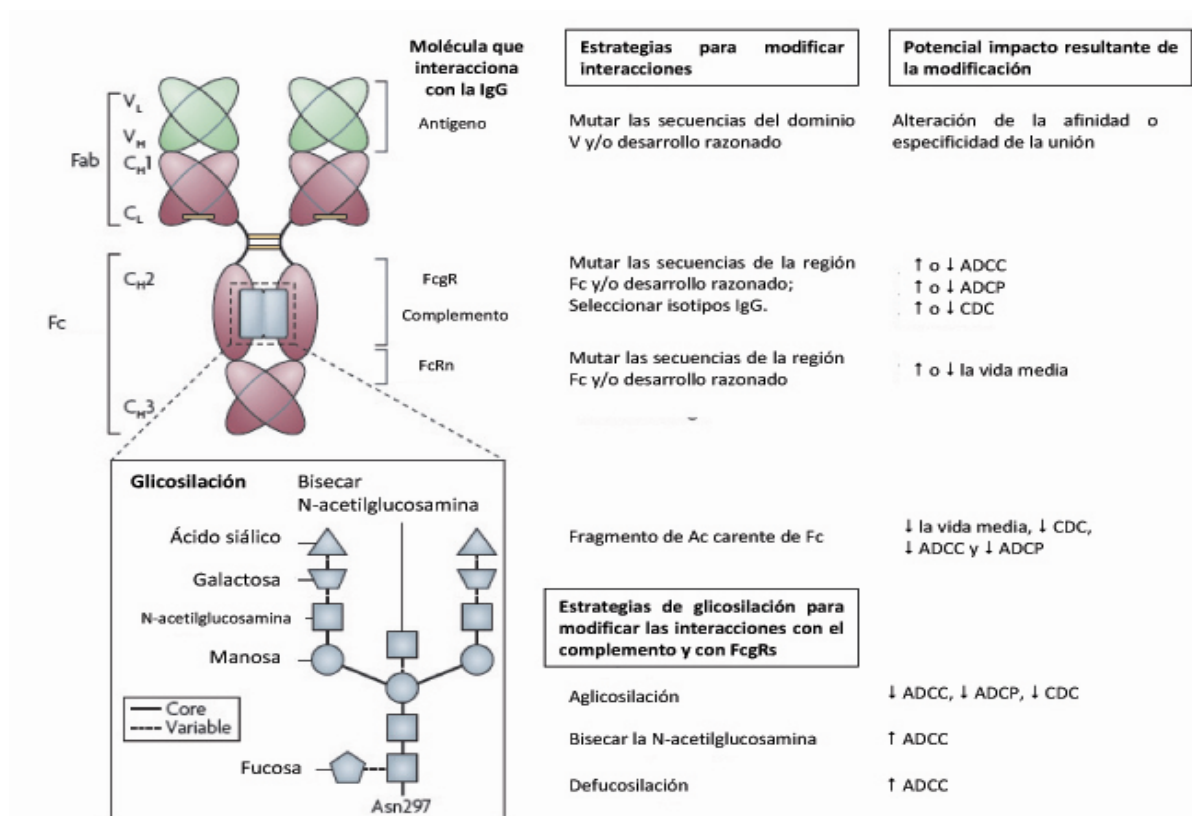


Figura 9. Estructura y función de los Ac en inmunoterapia del cáncer. Se muestra la estructura tetramérica de una molécula de IgG (150 kDa) y las posibles modificaciones con fines inmunoterapéuticos de la región Fab (modificación de la afinidad y/o especificidad) y/o de la región Fc (modulación de funciones efectoras y/o vida media en suero). Las funciones efectoras pueden modularse también mediante glicoingeniería de la región Fc, especialmente en el residuo conservado asparagina (Asn297) localizado en CH2. Puentes disulfuro (barras amarillas); CDC, citotoxicidad dependiente de complemento; ADCC, citotoxicidad celular dependiente de Ac; ADCP, citotoxicidad celular dependiente de fagocito. Modificado de Chan *et al* (2010) ¹⁶⁸.

6.1.3. Mecanismos de acción de los AcMo

El efecto terapéutico de los AcMo “desnudos” o IgG nativas depende de su capacidad de reconocimiento y bloqueo de dianas específicas mediante el dominio Fab (o mecanismos independientes de Fc) y/o de sus propiedades como moléculas efectoras de la respuesta inmunitaria (o mecanismos dependientes de Fc) ¹⁶⁸. Un mismo AcMo puede presentar un único mecanismo de acción (MDA) o bien varios de ellos.

Los AcMo con MDA independientes de Fc suelen neutralizar la actividad de una molécula determinada presente en la célula tumoral que sea necesaria para la biología de dicha célula (**Figura 10**). Hay AcMo, como rituximab, que al unirse a la célula tumoral activan de forma directa programas de muerte celular no apoptótica derivados de un aumento de permeabilidad de las membranas lisosomales y de la producción de especies reactivas de oxígeno o nitrógeno ^{174,175}. Otros AcMo, como los dirigidos contra receptores de la familia del TNF, inducen muerte celular apoptótica tras unirse a su Ag diana ¹⁷⁶, y otros Ac, como cetuximab (**Tabla 4**), inducen indirectamente la muerte celular al unirse a su diana y bloquear interacciones ligando-receptor, inhibiendo así la señalización necesaria para la viabilidad o crecimiento de la célula tumoral. En este caso, los AcMo pueden

neutralizar la unión del ligando natural, la homo o heterodimerización del receptor o potenciar la destrucción endocítica del receptor ¹⁷⁷. El bloqueo de la interacción ligando-receptor también sirve, entre otros, para inhibir procesos angiogénicos (bevacizumab, **Tabla 4**) ¹⁷⁸, bloquear la señalización inhibidora del tumor dirigida a células inmunitarias o bloquear co-receptores inhibidores presentes en ciertas células del sistema inmunológico (ipilimumab o nivolumab, **Tabla 4**) ¹⁷⁹⁻¹⁸¹.

Los MDA dependientes de Fc de un AcMo (**Figura 10**) varían según su capacidad para activar la cascada del complemento (citotoxicidad dependiente de complemento o CDC) ¹⁷⁰ y/o interactuar con los receptores FcγR de varios tipos celulares induciendo ADCC y/o ADCP ¹⁷¹. Algunas subclases de IgG, sobre todo IgG1 e IgG3, son potentes activadores de la vía clásica del complemento. La unión de dos o más moléculas de IgG a la superficie celular induce la unión de alta afinidad de la proteína sérica C1q al dominio Fc, paso crucial para el inicio de la cascada del complemento que termina con la formación de poros en la membrana por el complejo de ataque a membrana o MAC y la lisis de la célula diana ¹⁷⁰. Además, la producción de moléculas quimiotácticas como son C3a y C5a recluta a macrófagos y granulocitos e induce un aumento de la permeabilidad vascular que facilita la entrada del AcMo al MAT ¹⁷⁰. El efecto neto de la CDC depende de la cantidad de proteínas del complemento en sangre ¹⁸² y de la presencia de variantes genéticas como el polimorfismo C1qAla [276A/G], que correlaciona con mejor respuesta clínica a rituximab ¹⁸³. La presencia de mutaciones puntuales en aa de la región Fc o de la región bisagra también puede potenciar la CDC siempre que faciliten la unión del Ac a la molécula C1q ¹⁸⁴.

Si la porción Fc de un Ac de la clase IgG, que está opsonizando una célula tumoral, se une a un receptor activador FcγRIIIA presente en las células NK éstas liberarán moléculas contenidas en gránulos citotóxicos como la perforina, granzima y granzima que lisarán la célula tumoral mediante el proceso llamado ADCC ¹⁷¹. Si la interacción se da con un receptor FcγRI presente en neutrófilos y macrófagos, entonces puede inducir fagocitosis de la célula tumoral mediante ADCP ¹⁷¹. Por último, si la porción Fc interactúa con receptores FcγR de las DC, se puede producir endocitosis y presentación cruzada de Ag tumorales y la inducción de respuestas T adaptativas específicas contra el tumor ^{185,186}. Como ocurre en la CDC, la eficacia clínica de las funciones efectoras dependientes de FcγR está condicionada por la presencia de variantes genéticas. Los pacientes que presentan el polimorfismo Val158 en el receptor FcγRIIIA tienen mayor afinidad por la IgG1 que los pacientes con el alelo Phe158 lo que se traduce en una mayor actividad ADCC *in vitro* y mayores tasas de respuesta clínica ^{187,188}. En el caso de la presentación cruzada no se han descrito variantes genéticas que impliquen diferentes tasas de respuesta, sin embargo, el balance entre FcγR activadores e inhibidores es crucial en el proceso de maduración de las DC ¹⁸⁹. Por ello, los Ac que favorecen la señalización via FcγR activadores (FcγRIIA y FcγRIIIA) promueven la maduración de las DC convencionales ¹⁹⁰, mientras que la inhibición del receptor inhibidor FcγRIIB conlleva una mayor presentación de Ag *in vitro* e *in vivo* ^{191,192}.

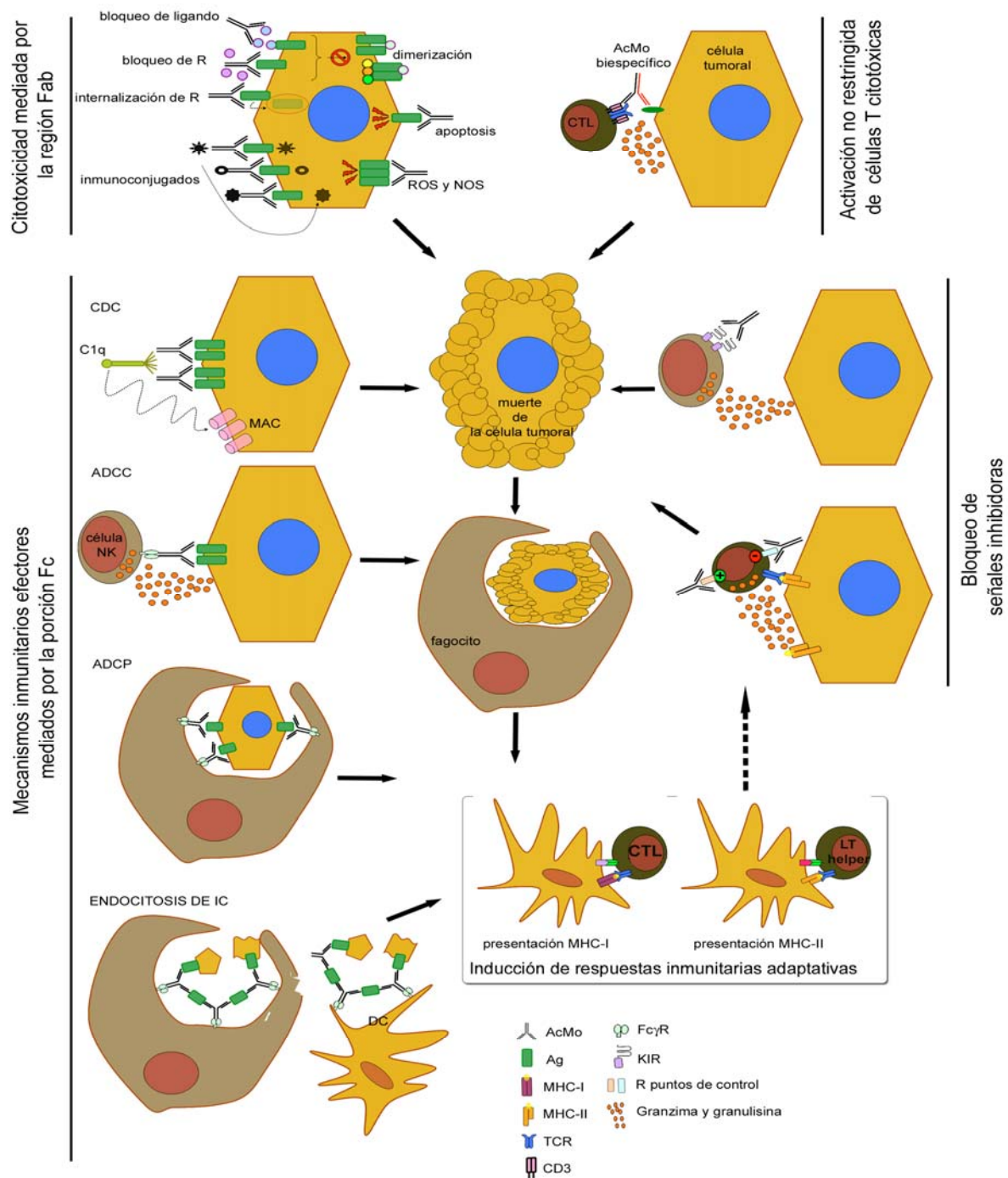


Figura 10. Mecanismos de acción (MDA) de los AcMo en inmunoterapia del cáncer. Los MDA de los Ac antitumorales son diversos. Aquí, se muestran cuatro estrategias diferentes. *Citotoxicidad directa o indirecta mediada por la región Fab:* los Ac pueden alterar vías de señalización tumoral neutralizando ligandos o receptores, disminuyendo la densidad de receptores en la superficie celular al inducir su internalización o bloqueando procesos de oligomerización del receptor. Otros Ac inducen muerte celular directa (apoptótica y no apoptótica). Aunque no incluidos en el texto, en la figura se muestran algunos tipos de inmunconjugados (ADC), Ac unidos a una droga, un radioisótopo o una toxina. *Mecanismos inmunitarios efectores mediados por la porción Fc:* se muestra la activación de proteínas solubles del complemento a través de la vía clásica (CDC) y la activación de FcγRs ubicados en células NK (ADCC), macrófagos (ADCP) o DCs (endocitosis de inmunocomplejos (IC)). *Activación no restringida de células T citotóxicas y activación de células NK:* CTLs infiltrados en el tumor pueden ser activados contra las células tumorales, independientemente de la especificidad del receptor de célula T (TCR). Esta estrategia abarca los Ac biespecíficos y antagonistas de señalización inhibitoria o agonistas de señalización activadora de células citotóxicas (células NK y CTLs). *Respuesta inmunitaria adaptativa:* por medio de todos los MDA descritos se potencia la muerte de la célula tumoral, la fagocitosis de Ag tumorales y la consiguiente inducción de respuestas inmunitarias adaptativas de dos maneras: presentación cruzada de Ag tumorales en contexto de MHC de clase I y cebado de células T citotóxicas, y presentación en contexto de MHC de clase II y cebado de células T helper. Esta respuestas pueden conducir a una inmunidad antitumoral potenciada, y posiblemente, persistente. Modificado de Weiner *et al* (2012) ¹⁹³.

Objetivos

CCR7 es un receptor que regula numerosas funciones celulares que contribuyen a la progresión de la enfermedad tumoral. Usar dicho receptor como diana de agentes con actividad citotóxica o de inhibidores de sus vías de señalización puede ser una herramienta terapéutica útil en neoplasias hematológicas o epiteliales. Con el fin de encontrar las mejores vías terapéuticas dirigidas contra este receptor nos propusimos los siguientes objetivos concretos.

1. CCR7 como diana terapéutica en LLC

1.1. Caracterización de las vías moleculares activadas por CCR7 en LLC

- Determinar cuáles son las vías de señalización inducidas por los ligandos de CCR7 en las células de LLC y establecer su papel en diferentes procesos celulares

1.2. Caracterización de los MDA de los AcMo contra CCR7 en LLC

- Selección de los AcMo candidatos
- Estudios de los MDA *in vitro*, *in vivo* y *ex vivo*

2. CCR7 como diana terapéutica en otros desórdenes linfoproliferativos: LPLT

2.1. Caracterización de los MDA del AcMo contra CCR7 en LPLT

- Estudios de los MDA *in vitro* e *in vivo*

3. CCR7 como diana terapéutica en neoplasias de órgano sólido: CM

3.1. Caracterización de los MDA del AcMo contra CCR7 en CM

- Estudios de los MDA *in vitro*

Materiales y Métodos

1. Muestras de LLC y LPLT

Todos los pacientes que donaron muestras para los diferentes estudios fueron diagnosticados de LLC o LPLT conforme a los criterios clínicos, morfológicos e inmunofenotípicos estándar^{125,141}. La citogenética de cada paciente fue determinada mediante hibridación fluorescente *in situ* (FISH) según los procedimientos rutinarios. Todos los pacientes analizados han estado sin tratamiento durante al menos dos meses previos a la extracción de la muestra. En ambas enfermedades, las muestras de SP se obtuvieron tras la firma de un consentimiento informado según lo estipulado en la Declaración de Helsinki y bajo un protocolo supervisado y aprobado por el Comité Ético del Hospital Universitario de la Princesa. A partir de la SP recién donada se aisló la fracción celular mononuclear (PBMC) y se incubó en medio RPMI-1640 suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS) inactivado por calor, penicilina (100U/ml) y estreptomicina (100 µg/ml).

2. Líneas celulares

Las líneas de adenocarcinoma mamario MCF-7 y MDA-MB-231, elegidas debido a sus altos niveles de expresión de CCR7 y cortactina, en comparación con células sanas^{160,194}, se obtuvieron de la ATCC (*American type culture Collection*) y se cultivaron en medio DMEM suplementado con 10% de FBS, L-glutamina 2mM y penicilina (100U/ml) y estreptomicina (100 µg/ml). Las células RS11846 fueron cedidas por el Dr. Zapata, las células SUPT-11 por el Dr. Stern y las células HEK-293 por el Dr. Sánchez-Madrid.

3. Reactivos

Para los ensayos de citotoxicidad, el AcMo terapéutico alemtuzumab fue facilitado por la farmacia hospitalaria del Hospital Universitario de la Princesa. Las versiones purificadas del AcMo múrido contra CCR7 humano (clon 150503, isotipo IgG2a) y de su control de isotipo (IC) respectivo se obtuvieron de R&D Systems. Los Ac dirigidos contra cortactina (H222), p-p44/p42-ERK1/2 (Thr202/Tyr204)(E10), p-JNK(Thr183/Tyr185Ab), p-p38-SAPK(Thr180/Tyr182Ab), p-ATF2, p-AKT(S473), p-MLC(S19), AKT, MLC, JNK, p38-SAPK y ERK1/2 se obtuvieron de Cell Signalling Technology. Los Ac contra RhoA (119) de Santa Cruz Biotechnology y el Ac contra cortactina total (p80/p85)(4F11) de Millipore. Muchos de estos Ac primarios se marcaron con Ac secundarios específicos de especie conjugados con Alexa Fluor 488 o Alexa Fluor 555 (Invitrogen). Los filamentos de actina se tiñeron con faloidina-Alexa Fluor 647 (Invitrogen). Las CK humanas recombinantes CCL19 y CCL21 se obtuvieron de PeproTech. Los inhibidores químicos SP600125, SB203580, PD98059, wortmanina, LY-294002, e hidroxifasudil (H4413) se compraron a Sigma-Aldrich, y los inhibidores U0126, Y-27632 y la toxina pertúsica (PTX) a Calbiochem. La matriz tumoral Matrigel se obtuvo de BD Biosciences. Para determinar la viabilidad celular se usó el

marcador de DNA 7-aminoactinomicina-D (7-AAD) sólo o en combinación con Anexina-V conjugada con el fluorocromo FITC, ambos de BD Biosciences.

4. Niveles de expresión en superficie de CCR7, CD52 y CD20

Los niveles de expresión de CCR7, CD52 y CD20 se determinaron en células B y células T mediante citometría de flujo (CMF) usando AcMo dirigidos contra CD5-FITC, CD19-APC y CD3-APC-H7 (todos ellos de BD Biosciences) con el fin de discriminar entre ambos tipos de linfocitos, y AcMo conjugados con PE y dirigidos, respectivamente, contra CCR7 (R&D), CD52 (BD Biosciences) y CD20 (Biolegend). En todas las muestras se incluyó un IC marcado con PE. La inmunofluorescencia se analizó en un citómetro de flujo modelo FACSCanto II usando los programas de análisis Infinicyt v.1.3.0 (Cytognos) y Diva v.2.4 (BD Biosciences). Salvo que se indique lo contrario, los resultados se presentan como el porcentaje de células positivas para CCR7 y/o como intensidad mediana de fluorescencia relativizada al IC (RMFI).

5. Citotoxicidad celular dependiente de complemento (CDC)

Para los ensayos de CDC se sembraron 2×10^5 PBMC por pocillo en placa p96 de fondo en U junto con varias concentraciones de los AcMo estudiados. Tras 30 minutos de incubación se lavó el exceso de AcMo y por cada concentración se añadió medio RPMI-1640 conteniendo 25% de complemento de conejo activo (Serotec) y medio conteniendo 25% de complemento inactivado previamente por calor. Tras hora y media a 37°C, las células se marcaron con AcMo con el fin de discriminar las diferentes poblaciones y con 7-AAD como colorante de exclusión de viabilidad. El porcentaje de células no viables se analizó mediante CMF, y el porcentaje de lisis específica se calculó con la siguiente fórmula: $\% \text{ SL} = 100 \times (\% \text{ células muertas con complemento activo} - \% \text{ células muertas con complemento inactivo}) / (100 - \% \text{ células muertas con complemento inactivo})$.

6. Citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC)

Para los ensayos de ADCC, las células diana (D) se incubaron media hora con 10 µg/ml de los distintos AcMo analizados y las células NK se aislaron de PBMC de donantes sanos mediante selección negativa usando un kit de aislamiento de células NK y separación magnética (Miltenyi Biotec). Posteriormente, las células NK se marcaron con un colorante vital (calcein-UV Cell Tracker, Invitrogen), se estimularon con IL-2 y se usaron como células efectoras (E) a un ratio E:D de 6:1. Tras 4 horas, se analizó el porcentaje de células D muertas según la siguiente fórmula; $\% \text{ SL} = 100 \times (\text{ER-SR}) / (\text{MR-SR})$. Donde ER, SR y MR representan la muerte celular experimental, espontánea y máxima, respectivamente.

7. Supervivencia y apoptosis

Para estudiar si CCR7 aumenta la supervivencia celular, las células de los pacientes se sembraron en una placa de 96 pocillos a una densidad de 10^6 células/ml y se incubaron en presencia o

ausencia de los ligandos de CCR7 (1µg/ml) y de inhibidores de PI3K, ROCK o MAPK. La viabilidad celular se determinó a diferentes tiempos mediante doble tinción con Anexina-V-FITC y 7-AAD que permite discriminar entre células necróticas (7-AAD⁺AV⁺), apoptóticas (7-AAD⁺AV⁻) y viables (7-AAD⁻AV⁻). Por otro lado, para determinar si los AcMo contra CCR7 inducen apoptosis de forma directa, 10⁵ células se incubaron con AcMo contra CCR7 soluble a una concentración final de 2µg/ml en medio RPMI-1640 completo. En otra aproximación, el AcMo purificado fue adherido a sustrato en placas de 96 pocillos de fondo plano mediante incubación durante 24 horas y de forma previa a la adición de las células en dichos pocillos. Cada 24 horas se extrajo una muestra de cada punto analizado y se determinó la viabilidad celular. Por último, para analizar si los AcMo contra CCR7 inducen apoptosis de forma indirecta, las células se cultivaron a una densidad de 10⁶ células/ml junto con los AcMo estudiados antes de la adición de los ligandos (1µg/mL). La viabilidad celular se determinó cada 24 horas de la misma manera descrita con anterioridad.

8. Proliferación

Para estudiar proliferación celular, las células en estudio se tiñeron con 5mM CellTrace Violet (Invitrogen) según el protocolo del fabricante. Tras estimulación con las CK, cada 24 horas un total de 5x10⁴ células fue analizado en CMF en un citómetro FACSCantoII BD con excitación de 405-nm y un filtro de emisión de 450/40 con el fin de discriminar los picos que representan las sucesivas generaciones de células vivas. La tasa de crecimiento se calculó en base a la siguiente fórmula: $GR = (\text{células CellTrace}^+ (t0) - \text{células Celltrace}^+ (tX)) / (\text{células CellTrace}^+ (t0))$.

9. Migración

Para el estudio de la quimiotaxis de linfocitos se usaron cámaras de Transwell con un diámetro de 6.5mm, un grosor de 10µm y un tamaño de poro de 5µm de diámetro (Costar). En cada cámara superior se cargó un total de 5x10⁵ células resuspendidas en medio suplementado con 0.5% de BSA. Las CK (1µg/ml) se añadieron a la parte inferior del pocillo. Tras 4 horas, las células que migraron se tiñeron con marcadores específicos y 7-AAD y se contaron en CMF. El porcentaje de células migradas se calculó según la siguiente fórmula: $\% \text{ input} = 100 \times (\text{n}^\circ \text{ de células en la parte inferior de la cámara} / \text{n}^\circ \text{ de células cargadas en la parte superior})$. Para las células epiteliales se usaron cámaras de Transwell con un diámetro de poro de 8 µm (Costar) cubiertas con gelatina (1mg/ml) de piel bovina (Sigma-Aldrich). Las células se sembraron en la parte superior a una densidad de 10⁵ células/ml 24 horas antes de la adición del estímulo, tras el cual, las células se incubaron 24 horas más. Las células que migraron se separaron de la membrana con un tampón comercial formulado a base de Hanks y EDTA (Gibco). En todos los casos, los AcMo se añadieron 30 minutos antes de la adición de las CK y se mantuvieron a lo largo del experimento de migración.

10. Invasión

Para estos estudios, las células se incluyeron en Matrigel líquido (4°C). Dicha suspensión se incorporó a las cámaras de Transwell y se incubó a 37° hasta su completa solidificación. Entonces, se añadieron las CK en la cámara inferior y se incubaron las células durante 24 horas. Los AcMo se añadieron de forma previa a la inclusión de las células en la matriz.

11. Ensayos de migración trans-endotelial (TEM)

La migración a través de endotelio se examinó usando 4×10^4 células linfoides y monocapas de células HUVEC sembradas en cámaras de Transwell recubiertas con gelatina y activadas con TNF- α (15 ng/ml) según el procedimiento descrito por otros autores ¹²⁹.

12. Zimografía en gelatina

Las células tumorales (3×10^6), preincubadas en presencia/ausencia de AcMo contra CCR7, fueron estimuladas en presencia/ausencia de sus ligandos durante 24 horas. De cada punto se separaron células y sobrenadante. Estos últimos se concentraron hasta un volumen final idéntico en todas las condiciones. Las zimografías se realizaron en geles SDS-PA (10%) con 0,1% de gelatina como se ha descrito con anterioridad ¹²⁹. Tras la electroforesis se renaturalizaron las proteínas lavando los geles con tampón a base de 2.5% Triton X-100 y se incubaron 24 horas a 37°C con tampón de revelado (50 mM Tris pH 7.5, 200 mM NaCl, 10mM CaCl₂). Tras tinción con Azul de Coomassie al 0.5%, se cuantificó la actividad gelatinolítica en un equipo LAS1000 (FujiFilm).

13. Microscopía de fluorescencia

Para estos estudios las células se fijaron en paraformaldehído y se permeabilizaron usando Triton-X-100 al 0.2%. Tras los correspondientes ciclos de lavado y bloqueo, las células se marcaron secuencialmente con Ac primarios contra diferentes proteínas y con los Ac secundarios específicos de especie conjugados con fluorocromo. Las imágenes se adquirieron en un microscopio Leica-DMR (Leica) equipado con una cámara Leica-DFC360FX y el software Leica Application Suite V.3. El análisis de las imágenes se realizó con el software ImageJ.

14. Western blot (WB)

Para obtener lisados celulares se usó el tampón RIPA. La misma cantidad de proteína fue analizada mediante SDS-PAGE e inmunoblot. Cuando hizo falta, las membranas se analizaron primero con Ac contra las proteínas fosforiladas, y después, se reanalizaron con Ac dirigidos contra la cantidad total de la misma proteína. Las bandas se visualizaron usando equipos de quimioluminiscencia (Amersham Pharmacia Biotech) y cuantificadas con el equipo LAS1000 (FujiFilm).

15. Pull-down de RhoA

Los niveles de RhoA-GTP se determinaron con el uso de fragmentos recombinantes purificados correspondientes al dominio de unión a Rho de la proteína Rhotekin (que reconoce y une específicamente la forma activa de RhoA, unida a GTP) fusionado a glutatión S-transferasa (GST-RBD, *Glutathione-S-Transferase Rhotekin Rho-Binding Domain*). Tanto la producción como la purificación de GST y GST-RBD se llevaron a cabo según procedimientos estándar así como la precipitación de las proteínas unidas a RhoA¹⁹⁵. El análisis de los precipitados se llevó a cabo mediante WB.

16. Modelo *in vivo* de linfoma de célula del manto (LCM)

La línea celular Granta-519 se adquirió de la colección del banco alemán de microorganismos y cultivos celulares (DSMZ). La expresión de CCR7 en la línea fue confirmada mediante CMF. Para este modelo, se usaron ratones hembra SCID Fox Chase CB17/lcr- (Harlan Laboratories) de 8 ± 1 semanas que se mantuvieron en las instalaciones de Vivotecnia bajo condiciones estándar de esterilidad según los protocolos aprobados por las directivas europeas (86/609/EEC/2003/65/EC) y las leyes españolas (RD 1201/2005). Los procedimientos *in vivo* fueron aprobados por el comité ético de nuestro centro. Los animales se incluyeron en dos grupos experimentales según el método de estratificación por peso corporal. La vía de inoculación de las células tumorales (5×10^6 células) fue la vía subcutánea, resultando en un modelo de tumor localizado palpable en el flanco posterior derecho en torno a los 7 días. Como modelo de intervención temprana, se trataron 5 animales a los días 2, 6 y 10 post-xenoinjerto con 200 μ g de AcMo múrido contra CCR7 humano administrado vía intraperitoneal. Como grupo control, 5 animales recibieron PBS estéril en los mismos días. Los diámetros mayor (D) y menor (d) del tumor se midieron tres veces por semana a partir de que D fuera >4 mm y el volumen del tumor se calculó según la fórmula $V = D \times d^2 / 2$. La tasa de inhibición de crecimiento del tumor se calculó según la fórmula: $IR(\%) = [100 - (V1/V2)] \times 100$ donde V1 es el volumen tumoral medio del grupo tratado con el AcMo contra CCR7 y V2 es el volumen tumoral medio en el grupo control. Los animales con tumores con $D \geq 15$ mm o con signos de ulceración se sacrificaron por cuestiones éticas. Los órganos y tumores fueron recolectados, pesados y fijados en tampón con 4% de formaldehído para los análisis histológicos mientras que la MO y el bazo se conservaron brevemente en PBS frío y se analizaron mediante CMF. Para ello, un millón de células de MO o bazo se marcaron con un AcMo contra el Ag CD20 (clon 2H7) conjugado con el fluorocromo PB. CD20 es un Ag específico de células B humanas y sin reacción cruzada con células linfoides de ratón. El estudio de apoptosis en las células tumorales se llevó a cabo con el kit Anexina-V/7-AAD.

17. Modelo *in vivo* de leucemia de célula T

Para este modelo se eligieron células primarias procedentes de un paciente con LAL-T con fenotipo de célula no muy inmadura (CD34-, CD1a-, CD10-) y expresión de CCR7 confirmada mediante CMF. Dichas células se implantaron en ratones deficientes RAG2-/- γ mac-/-¹⁹⁶, tanto machos como hembras, criados en el animalario del Centro de Biología Molecular Severo Ochoa bajo condiciones de esterilidad. Los procedimientos experimentales se llevaron a cabo según las guías de manipulación y experimentación animal del centro y todos los procedimientos *in vivo* fueron aprobados por el comité ético de nuestro centro. Las células tumorales (5×10^5 células) se inocularon vía intraorbital, resultando en un modelo ortotópico de leucemia. Como modelo de intervención tardía, se trataron los animales en el momento en que la infiltración en MO del clon patológico fuera igual al 30% de la celularidad total. A partir de ese momento, se trataron 5 animales con el Ac contra CCR7 y otros 5 con un IC. En ambos casos, se administraron dosis de 200 μ g tres veces por semana. Los métodos de recolección de órganos y tejidos fueron similares a los indicados para el modelo de LCM. Las células tumorales se identificaron mediante CMF gracias al marcaje con CD45, CD3, CD5 y CD7.

18. Análisis estadísticos

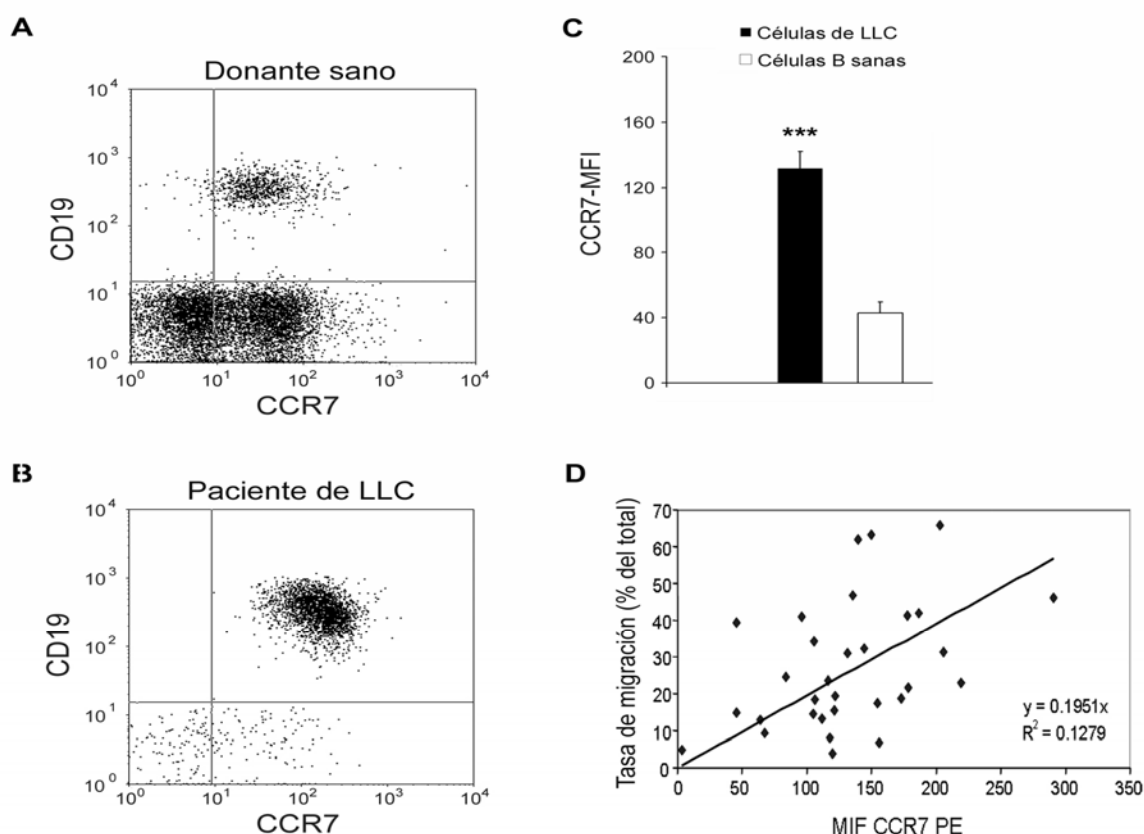
Para los análisis estadísticos se usó el programa SPSS (*The Statistical Package for the Social Sciences*) versión 15.0 (SPSS Inc). Para comparar medias entre dos grupos independientes se utilizó el test de Student. Cuando se compararon 3 o más grupos se realizaron análisis de la varianza de una vía (ANOVA) seguido por el test *post hoc* de Bonferroni. Si, según el test de Levene, las varianzas no eran homogéneas, la comparación se llevó a cabo mediante el test de la U de Mann-Whitney. El coeficiente de correlación de Pearson se usó para analizar la asociación entre la intensidad media de fluorescencia de CCR7 (MIF) y la respuesta migratoria a CCL19 o la supervivencia celular mediada por los ligandos de CCR7. El test no paramétrico de Wilcoxon se usó para analizar la supervivencia mediada por los ligandos de CCR7 en LLC. Las diferencias se consideraron significativas para aquellos p-valores por debajo de 0.05 (*), 0.01 (**) o 0.001(***). Salvo que se indique lo contrario, los resultados se presentan como medias \pm SE (error estándar de la media).

Resultados

1. CCR7 como diana terapéutica en LLC

1.1. Caracterización de las vías de señalización molecular: migración y supervivencia

Las células de LLC se caracterizan por una expresión intensa del receptor CCR7 en la superficie celular, muy superior a la observada en células B de sujetos sanos (**Figura 11-A-B-C**). En el clon patológico, dicho receptor es funcional y está implicado en procesos migratorios hacia los ligandos CCL19 y CCL21 (**Figura 12-A**) y, aunque no hemos hallado correlación entre los niveles de expresión de CCR7 y la tasa de migración hacia sus ligandos (**Figura 11-D**), datos previos de nuestro grupo sí que apuntaban a una relación entre dicha tasa y la presencia de adenopatías en pacientes de LLC⁵⁴. Por ello, como primer objetivo de esta tesis decidimos estudiar las vías de señalización activadas por CCR7 en células de LLC con el fin de hallar los mecanismos que pudieran favorecer la migración de las células patológicas a los OLS y, por tanto, pudieran estar relacionadas con la presencia de adenopatías. Al mismo tiempo, estudiamos si el uso de inhibidores específicos de estas vías podía constituir una nueva estrategia terapéutica en el tratamiento de la LLC consistente en impedir la entrada de las células leucémicas en los nichos de supervivencia, haciéndolas por tanto más accesibles a la terapia de elección empleada en cada caso.



1.1.1. PI3K y ROCK controlan la migración inducida por CCR7

Como se puede observar en la **Figura 12-A**, la quimiotaxis inducida por CCL19 y CCL21 era sensible al uso de inhibidores de la enzima PI3K (wortmanina y LY-294002) y, sobre todo, de la enzima ROCK (Y-27632 y H4413/hidroxifasudil, el metabolito activo de fasudil). Dado que dichos inhibidores no afectaban a la viabilidad celular (**Figura 12-C**) pudimos descartar que la reducción en la tasa migratoria fuera debida a toxicidad inducida por los fármacos. De este mismo estudio también concluimos que la migración mediada por CCR7 en células de LLC no dependía de la actividad de las MAPK y que las vías moleculares de los procesos migratorios mediados por CCR7 eran ligeramente diferentes en células de LLC y en células B sanas. La migración de las células B obtenidas de donantes sanos, además de estar mediada por PI3K y ROCK, dependía de la enzima p38-SAPK (**Figura 12-B**). Además, la respuesta migratoria en células sanas era mayor hacia CCL21 que hacia CCL19, mientras que en el caso de la LLC ambos ligandos mostraron un comportamiento análogo. Por último, mientras que en la LLC la respuesta quimiotáctica hacia ambos ligandos en presencia de inhibidores se veía mermada en igual proporción, en células sanas los inhibidores afectaban más a la migración inducida por CCL19.

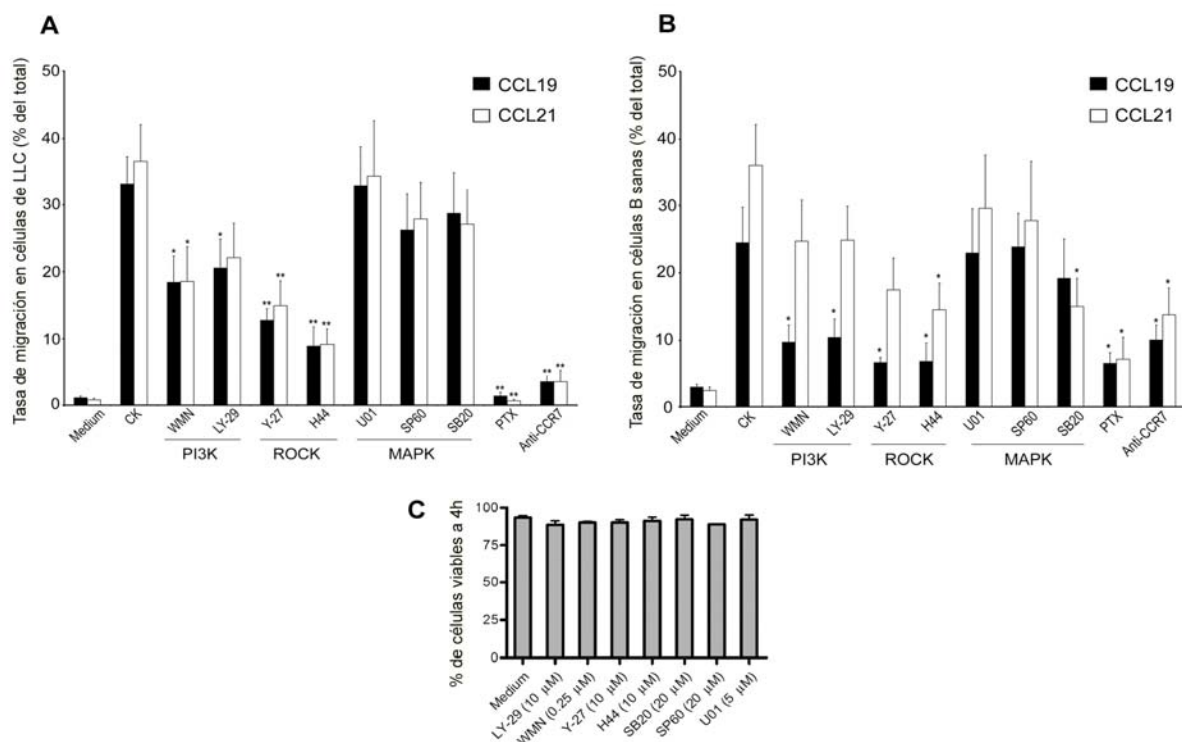


Figura 12. La quimiotaxis de células de LLC en respuesta a los ligandos de CCR7 está mediada por las vías de las enzimas PI3K y ROCK. A) Quimiotaxis en cámaras de Transwell inducida por las quimiocinas (CK) CCL19 (n=8) o CCL21 (n=12). Donde se indique, antes del ensayo de migración las células fueron tratadas durante una hora con los inhibidores de PI3K (10 μM LY-294002 y 250 nM wortmanina, WMN), de ROCK (10 μM Y-27632 y 10 μM H4413), de la quinasa de ERK1/2 o MEK (5 μM U0126), de JNK (20 μM SP600125), o de p38-SAPK (20 μM SB203580). La toxina pertúsica (PTX; 100 ng/mL) y un Ac contra CCR7 (10 μg/ml) se usaron como controles de la inhibición. B) PI3K, ROCK y p38-SAPK regulan la quimiotaxis mediada por CCR7 de células B sanas hacia CCL9 (n=11) o CCL21 (n=9). C) Efectos de los inhibidores a estudio sobre la viabilidad celular. Se muestra el porcentaje medio (n=6) de células viables (Anexina-V-7-AAD⁺) tras 4 horas de incubación con los inhibidores (el mismo tiempo empleado en los experimento de migración).

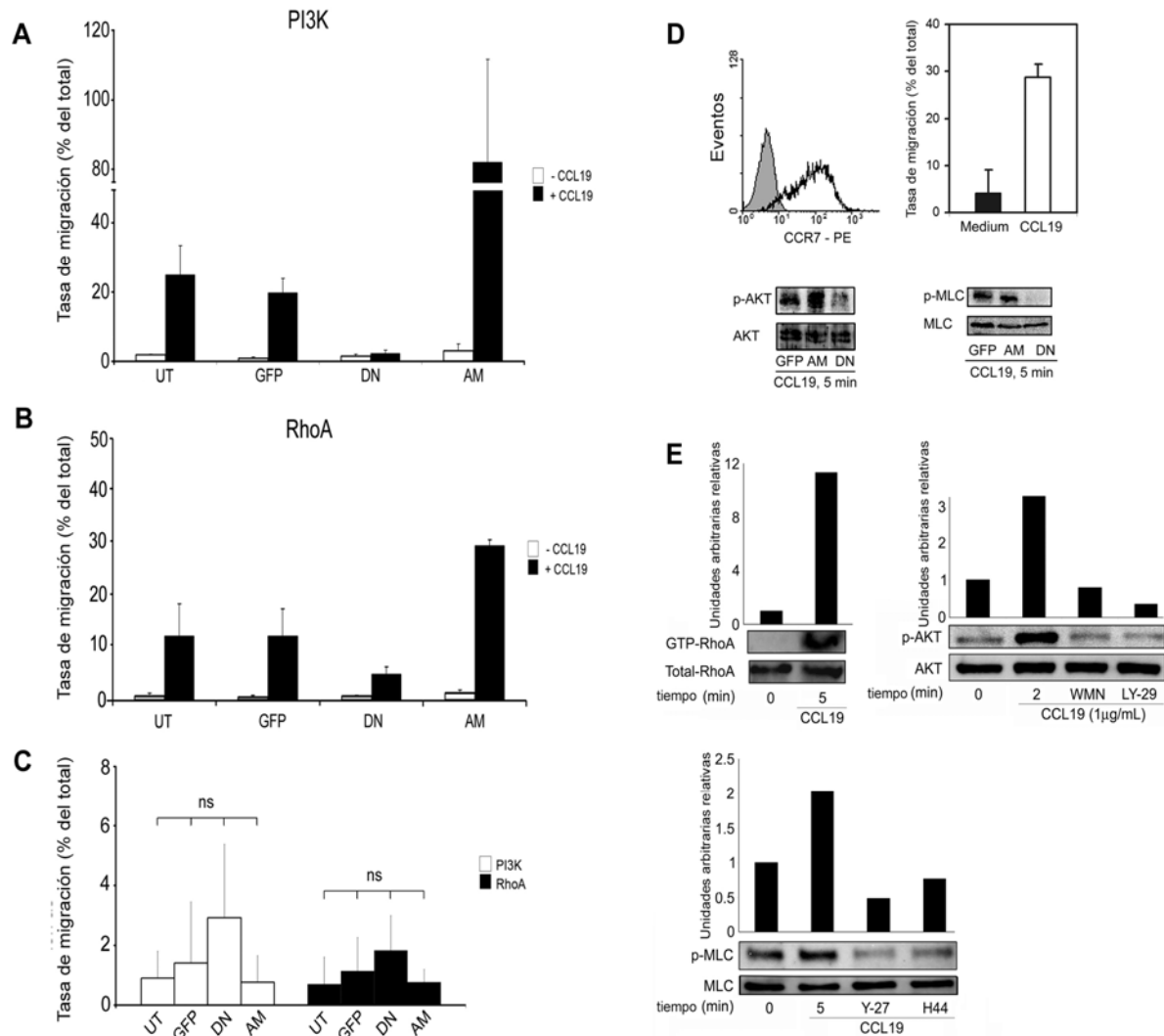


Figura 13. Efecto de las mutaciones en las enzimas PI3K y RhoA sobre la quimiotaxis mediada por CCR7 en células de LLC. A-B) Ensayos de quimiotaxis hacia CCL19 con células no transfectadas (UT), con células transfectadas con un control vacío (GFP) o con células transfectadas con formas DN (PI3K- Δ p85 α -GFP y pGFP-RhoA-N19), o AM (pCDNA3-p110CAAX y pEGFP-RhoA-C1-V14). PI3K (n=5), RhoA (n=5). C) Porcentaje de células de LLC nucleofectadas con las distintas construcciones estudiadas que migraron sin estímulo quimiotáctico (ns, no significativo). D) Efecto de las mutaciones descritas sobre la fosforilación de los substratos específicos de PI3K (AKT) y RhoA (MLC) en respuesta a la activación de CCR7. Los análisis se llevaron a cabo con la línea celular RS11846 que expresa CCR7 y migra en respuesta a CCL19. **Activación de RhoA y PI3K en respuesta a CCL19.** E) En el ensayo de *pull-down* de RhoA, el panel superior muestra la fracción activa de RhoA y el inferior los niveles totales de RhoA. La activación de CCR7 induce fosforilación de MLC que es sensible al uso de los inhibidores de ROCK. En el caso de PI3K, la activación de CCR7 induce fosforilación de AKT que es sensible a los inhibidores de PI3K. Se muestran las unidades arbitrarias obtenidas de relativizar la cuantificación de la forma fosforilada de la proteína a estudio entre la cantidad total de dicha proteína.

Posteriormente, y con el fin de confirmar el papel de PI3K y ROCK en la migración mediada por CCR7, llevamos a cabo experimentos de transfección transitoria usando plásmidos codificadores para versiones mutadas de PI3K y RhoA. La expresión de la forma dominante negativa (DN) carente de función, tanto de la subunidad reguladora p85 α de PI3K como de la proteína RhoA, inhibió la migración hacia CCL19 (**Figura 13-A-B**). Por el contrario, la expresión de la forma mutada constitutivamente activada (AM), tanto de la subunidad catalítica p110 de PI3K como la forma AM de RhoA, resultó en un incremento muy importante de la migración hacia CCL19. Como controles,

las células de LLC no transfectadas o transfectadas con un plásmido vacío conteniendo GFP (proteína fluorescente verde) mostraron una respuesta quimiotáctica similar (**Figura 13-A-B**). Como demostración de que la migración mediada por PI3K y RhoA es dependiente de la activación de CCR7 por sus ligandos, en ausencia de CK las formas AM de PI3K y RhoA eran incapaces por sí mismas de inducir migración celular (**Figura 13-C**). Por su parte, las formas DN no afectaban a la migración basal de las células de LLC que mostraban valores similares a los observados en células no tratadas. Además, comprobamos que, en presencia de CCL19, las formas AM de PI3K y RhoA inducían un aumento de la fosforilación de los sustratos AKT y MLC, mientras que las formas DN no (**Figura 13-D**).

Otras aproximaciones, como el uso de técnicas de *immunoblot*, confirmaron la implicación de las vías de PI3K/AKT y RhoA/ROCK. Mediante ensayos de *pull-down* usando construcciones con el dominio de unión a RhoA de la proteína Rhotekin (que reconoce y une específicamente la forma activa de RhoA unida a GTP) se pudo observar cómo la unión del ligando CCL19 a CCR7 aumentaba los niveles de RhoA activo (**Figura 13-E**). Además, corroboramos que la proteína MLC, una molécula efectora de la vía RhoA/ROCK e involucrada en la contracción actina-miosina y en migración celular, se fosforilaba tras la unión de CCL19 y con una cinética similar a aquella observada para la activación de RhoA. Dicha fosforilación de MLC era sensible a la presencia de los inhibidores de ROCK usados previamente en los experimentos de migración (Y-27632 y H4413/hydroxyfasudil). Por otro lado, y en apoyo del papel de PI3K en la migración de células de LLC mediada por CCR7, confirmamos que CCL19 también inducía la fosforilación del efector AKT/PKB, y que este proceso era inhibido por wortmanina y LY-294002 (**Figura 13-E**).

1.1.2. PI3K, ERK y JNK median supervivencia celular inducida por CCR7

Los estudios de inmunoblot mostraban que tanto CCL19 como CCL21 inducían una fuerte activación de ERK1/2 y de JNK, aunque ésta última menos intensa y más heterogénea entre pacientes (**Figura 14-A**). Sin embargo, esta activación no estaba directamente relacionada con la migración celular mediada por CCR7 (**Figura 12**). Por ello, nos planteamos la posibilidad de que estas vías estuvieran implicadas en otros procesos celulares, y más específicamente, en supervivencia celular. En un primer paso observamos cómo la exposición de células de LLC a CCL19 o CCL21 inducía un aumento moderado pero significativo de viabilidad celular de LLC a 72 horas (**Figura 14-B**). Después, nos planteamos la posibilidad de que las enzimas MAPK estuvieran relacionadas con supervivencia mediada por el receptor y por ello analizamos el efecto de los diferentes inhibidores sobre la protección inducida por CCL19 o CCL21. No se observó efecto con los inhibidores de ROCK o p38-SAPK, sugiriendo que estas vías no participaban en el efecto antiapoptótico mediado por CCR7 (datos no mostrados). Sin embargo, con los inhibidores de las enzimas PI3K (wortmanina), JNK (SP600125) y de MEK (U0126), la actividad protectora de CCR7 era significativamente menor que en aquellas condiciones en las que las células se cultivaron sólo con CK (**Figura 14-B**). Como ya

ocurriera con el estudio de la correlación entre la expresión de CCR7 y la capacidad migratoria en células de LLC, no se encontró correlación entre la expresión del receptor y la supervivencia celular mediada por el mismo (datos no mostrados).

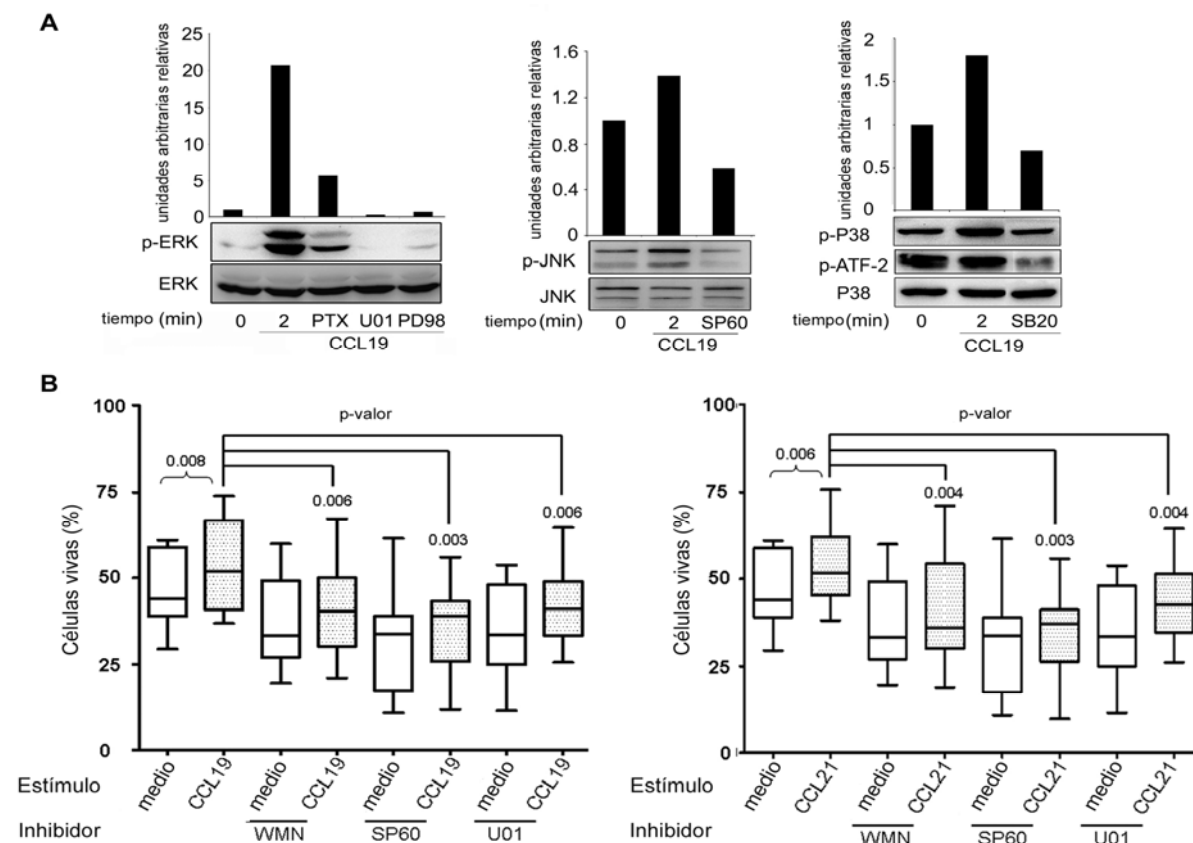


Figura 14. Efecto de la activación de CCR7 en la señalización mediada por MAPK y en la supervivencia de las células de LLC. A) CCR7 induce activación de ERK1/2 sensible a U0126 y PD98059, los inhibidores de la quinasa de ERK1/2 (MEK). Además, CCR7 activa JNK y p38-SAPK, siendo esta activación inhibida, respectivamente, por SP600125 y SB203580. Se muestran las unidades arbitrarias obtenidas de relativizar la cuantificación de la forma fosforilada de la proteína a estudio entre la cantidad total de dicha proteína. B) Los ligandos de CCR7 aumentan la supervivencia de las células de LLC. Las células de LLC se incubaron durante 72h en medio completo o en medio completo suplementado con CK y en presencia o ausencia de los inhibidores químicos a estudio. Se muestra el porcentaje de células viables representado como mediana, máximo, mínimo y percentiles 75% y 25%.

1.2. Terapia con AcMo dirigidos contra CCR7 en LLC

1.2.1. Caracterización *in vitro* del MDA del AcMo

A raíz de los resultados obtenidos parecía claro que inhibir la función y la señalización inducida por CCR7 con agentes químicos específicos podía ser una útil herramienta terapéutica que, por un lado, afectaría a la supervivencia del clon leucémico y, por otro, prevendría la migración a nichos de supervivencia y/o la formación de metástasis (**Figura 15**). Sin embargo, encontrar una aproximación dirigida a bloquear todas las funciones protumorales ejercidas por CCR7 conllevaría el desarrollo de una terapia combinada con varios inhibidores. Como se ha indicado anteriormente, una vía que ha revolucionado el tratamiento del cáncer en las últimas dos décadas, y especialmente en

oncohematología, ha sido el uso de AcMo dirigidos contra antígenos tumorales específicos o contra receptores y ligandos implicados en la proliferación y supervivencia de la célula tumoral. Esta aproximación es, en sí misma, una forma más sencilla de bloquear todas las vías de señalización activadas por CCR7 con un único agente, y por ello decidimos estudiar en profundidad el potencial terapéutico de un AcMo dirigido contra CCR7 en LLC y los MDA asociados a dicha molécula. La caracterización funcional de dicho AcMo incluyó estudios *in vitro* e *in vivo* dirigidos a determinar aspectos relacionados con la función mediada por la región Fab, entre otros, la neutralización de la migración, de la proliferación o de la supervivencia, y funciones asociadas a la región Fc tales como la inducción de ADCC o CDC sobre células leucémicas.

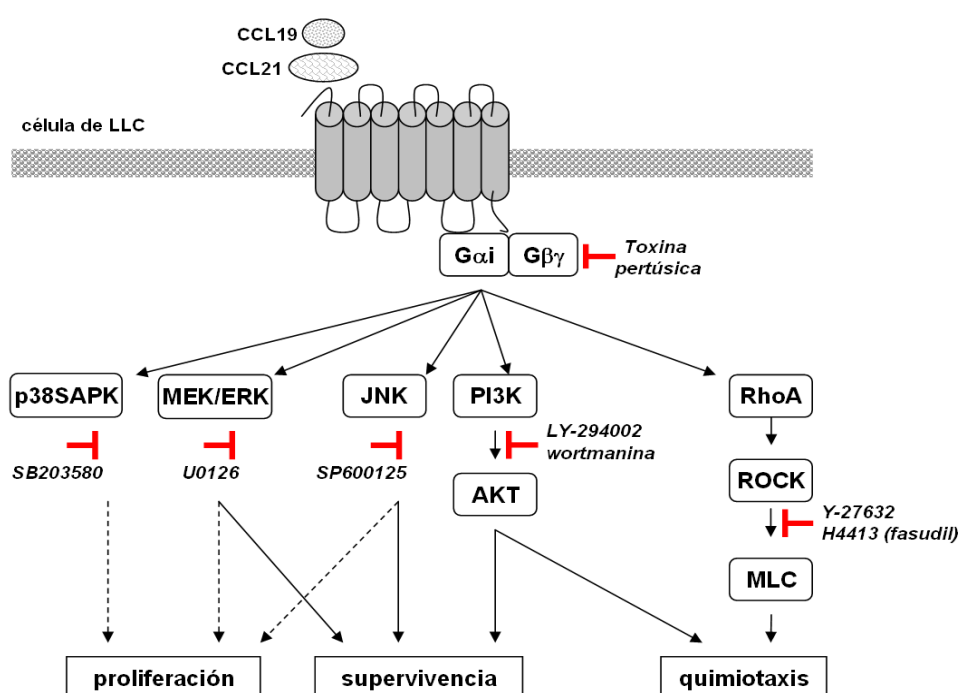


Figura 15. Resumen de los datos obtenidos de la señalización inducida por CCR7 en células de LLC relacionada con migración y supervivencia celular. Se muestran las enzimas y funciones afectadas por los inhibidores químicos empleados. Las líneas discontinuas indican funciones propuestas por otros autores.

En una primera fase, y usando células de LLC como diana, elegimos el Ac más idóneo de entre todos los comercialmente disponibles en aquel entonces (**Tabla 5**). Dos requerimientos *sine qua non* para ser elegido como el AcMo a caracterizar eran la unión específica a las poblaciones leucocitarias humanas CCR7⁺ y la capacidad de bloquear la señalización mediada por el receptor. Como se aprecia en la **Tabla 5** y en la **Figura 16**, el clon 150503, de ratón e isotipo IgG2a, era el candidato que reunía ambas condiciones superando a los demás candidatos. Entre sus cualidades destacaban mejores perfiles de expresión en poblaciones linfocitarias, mayores valores de intensidad mediana de fluorescencia y mayor bloqueo de procesos migratorios inducidos por los ligandos del receptor (**Figura 16-A**). Además, este clon no sólo no inducía endocitosis del receptor en presencia de CCL19 sino que bloqueaba dicho proceso comportándose como antagonista (**Figura 16-B**). La

endocitosis inducida por CCL21 no se testó ya que este ligando no induce endocitosis del receptor en LLC ⁵⁴. En lo referente a otras funciones independientes de Fc, este AcMo no inducía apoptosis directa de la célula tumoral (**Figura 16-C**) pues al analizar la viabilidad celular a 24 y 72 horas en células de LLC incubadas en presencia de dicho Ac no se observaban diferencias con respecto al control de isotipo. Por el contrario, las células incubadas en presencia de fludarabina sí mostraban un aumento de la muerte celular determinado por el doble marcaje Anexina-V-FITC/7-AAD. Sin embargo, y recordando que la exposición de células de LLC a CCL19 o CCL21 inducía un aumento moderado pero significativo de viabilidad de las células de LLC a 72 horas mediado por PI3K, JNK y ERK1/2 (**Figura 14-B**), potencialmente, este tipo de Ac puede inducir apoptosis de forma indirecta al privar a las células de LLC de señales de supervivencia inducidas por CCL19 y CCL21. Aunque este experimento no se ha llevado a cabo con LLC, en otras secciones se muestran resultados en otra patología linfóide que corroboran esta hipótesis.

Clon Casa comercial	Inmunógeno / Epítipo	Especie	Isotipo Clonalidad	Reactividad	MFI	Neutralizante
150503 R&D	Células L1.2/hCCR7 ECL2	m	IgG2a mo	h	+++	+++
2H4 BD	Células L1.2/hCCR7 na	m	IgM mo	h	+++	+
6B3 MBL	Péptido N-term hCCR7 N-term	m	IgG1 mo	h	++	-
3D12 BD	Péptido N-term + ECL2 N-term	r	IgG2a mo	h	++	-
4B12 Biolegend	Células RBL-2H3/mCCR7 na	r	IgG2a mo	m	+	-
E75 Epitomics	ECL3 ECL3	c	IgG p	h, m, r	+	-
Y59 Epitomics	Péptido N-term hCCR7 N-term	c	IgG p	h, m, r	+	-
H60 Santa Cruz	na	c	p	h, m, r	++	-

Tabla 5. Características de los diferentes Ac dirigidos contra CCR7 analizados. De cada clon se muestra el inmunógeno usado para la obtención del Ac, el epítipo contra el que se dirige dicho clon, la especie de origen, el isotipo, la clonalidad, las especies que reconoce, el patrón de fluorescencia en células de LLC y en células T (MFI) y la capacidad para bloquear procesos quimiotácticos en células de LLC. na, no disponible; ECL, lazo extracelular; h, humano; m, ratón; r, rata; c, conejo; mo, monoclonal; p, policlonal; +++, patrón muy bueno; ++, patrón regular; +, patrón malo; -, ausencia de efecto.

En lo referente a las funciones dependientes de región Fc, el clon 150503 no mediaba una actividad ADCC destacable ni con células NK humanas aisladas de sujetos sanos (**Figura 16-D**) ni con células NK aisladas de bazo de ratón (**Figura 16-E**). Como controles, los AcMo rituximab y alemtuzumab destacaban por mediar una elevada actividad ADCC con células NK humanas o mayor que el AcMo a estudio en el caso de usar células NK de ratón. La falta de actividad ADCC en ambos sistemas bien puede ser resultado de una baja afinidad de los FCγRs humanos por los Ac de origen

múrido, bien por una baja actividad del isotipo estudiado (IgG2a) para mediar ADCC con células de ratón, o bien, por la presencia de modificaciones postraduccionales que afecten al patrón de glicosilación de la molécula y que inhabiliten la ADCC con células NK humanas y múridas. Ninguna de las posibles explicaciones fue estudiada en más detalle pues dicho clon era muy eficaz induciendo lisis mediada por complemento (**Figura 16-F**) y para enfermedades de origen hematológico una potente CDC es un requisito muy deseable. La obtención de valores de lisis específica cercanos al 100% en presencia del clon 150503 y complemento, junto con todas las demás características citadas, hicieron que nos decantáramos por dicho AcMo para los siguientes estudios a realizar.

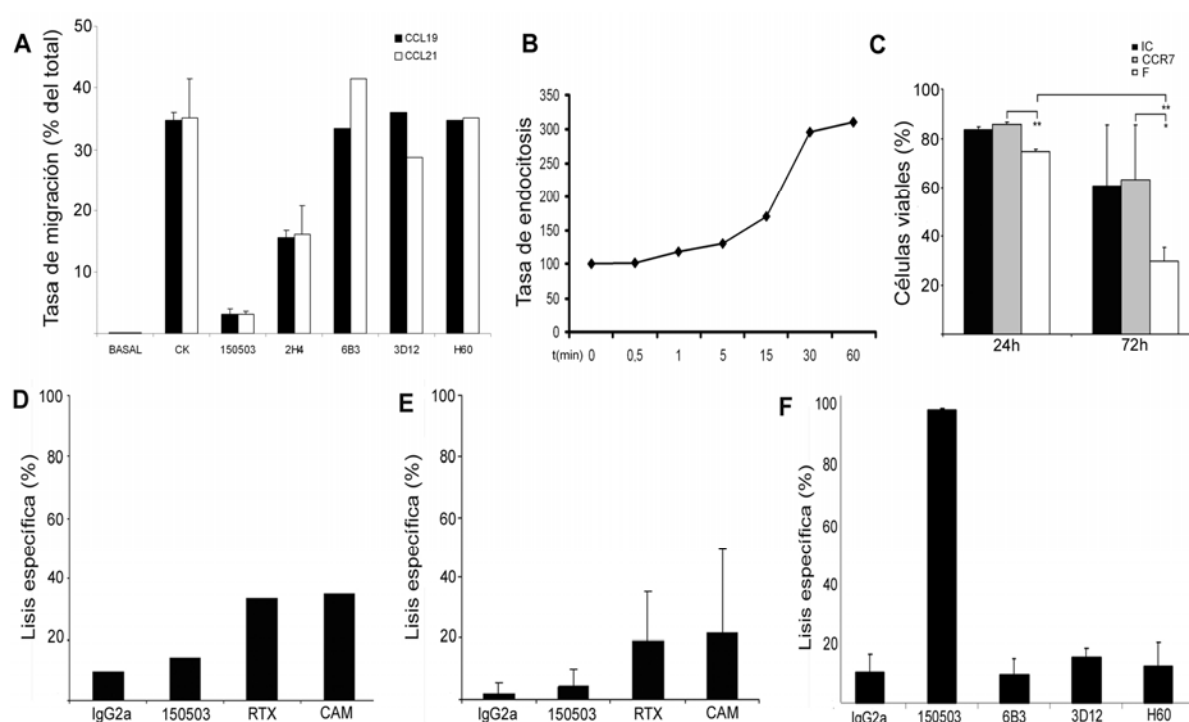


Figura 16. Caracterización *in vitro* con células de LLC de los MDA de diferentes clones de Ac dirigidos contra CCR7. A) Estudio del bloqueo de la migración hacia los ligandos de CCR7: basal, CK, 150503 y 2H4 (n=2) / 6B3, 3D12 y H60 (n=1). B) Ensayo de endocitosis del receptor tras la unión del AcMo 150503 (n=1). C) El clon 150503 contra CCR7 no media efectos proapoptóticos directos en células de LLC (n=3). D) Ensayo de ADCC con el clon 150503 y células NK humanas (n=1). E) Ensayo de ADCC con el clon 150503 y células NK de ratón (n=2). F) Ensayo de CDC con los clones candidatos y complemento de conejo (n=2). CK, quimiocina; IC, control de isotipo; F, fludarabina; RTX, rituximab (anti-CD20); CAM, alemtuzumab (anti-CD52).

1.2.2. Evaluación *in vivo* de la eficacia terapéutica del AcMo

Como se ha indicado anteriormente, los modelos múridos de LLC pueden suponer un impedimento a la hora de testar agentes terapéuticos. En nuestro caso, modelos singénicos o transgénicos quedan descartados dado que la elevada especificidad del Ac elegido para nuestros estudios hace que sólo reconozca dianas humanas o de primates no humano, pero no la diana en ratón. En cuanto a los modelos de xenoinjerto con células primarias en ratones la tasa de injerto es muy baja, la presencia de células de LLC en SP es relativamente corta en el tiempo y el patrón de diseminación de la enfermedad no se reproduce. Por ello, optamos por modelos de xenoinjerto con líneas celulares

establecidas. Sin embargo, nos encontramos con que la mayoría de las líneas establecidas no expresaban CCR7, y una de las que sí lo hacían (por ejemplo MEC-1) presentaba menores niveles que los vistos en LLC y no mostraba un patrón de diseminación parecido al de la LLC (datos no mostrados).

Todos estos factores hicieron que para demostrar *in vivo* la eficacia terapéutica nos decantáramos por un modelo de xenoinjerto de linfoma de célula del manto (LCM) humano. Esta alternativa ofrecía una serie de ventajas: 1) patrones de diseminación tumoral muy parecidos en pacientes de LLC y de LCM ¹⁹⁷; 2) el clon 150503 reconocía la diana en estas células tumorales y con perfiles de expresión de CCR7 similares a los de la LLC ⁵⁴; 3) el LCM es una de las entidades consideradas como nicho terapéutico potencial del AcMo contra CCR7.

Como se ha indicado en la sección de *Materiales y Métodos*, las células injertadas pertenecían a la línea celular Granta-519, establecida a partir de células primarias de un LCM agresivo. La selección de esta línea estuvo determinada por la elevada expresión de CCR7 en superficie y por la capacidad de los Ac del clon 150503 de bloquear *in vitro* la migración hacia los ligandos del receptor y de inducir *in vitro* CDC en las células tumorales (**Figura 17-A**). Como ocurriera en LLC, la migración celular de las células Granta-519 se inhibía en mayor proporción con el clon 150503 que con el clon 2H4, una IgM de ratón (**Figura 17-A**). Además, estudios previos de nuestro laboratorio confirmaban que dicha línea injertaba en ratones CB17 SCID, y dado que los MDA estudiados *in vitro* (CDC y neutralización de la diana) eran compatibles con la inmunidad innata remanente en estos ratones decidimos usar este modelo para evaluar la eficacia terapéutica *in vivo*.

En este modelo localizado de LCM, la intervención temprana con el AcMo contra CCR7 inhibía el crecimiento tumoral y retrasaba la aparición de tumores subcutáneos (**Figura 17-B-D**). Los primeros tumores palpables en los controles aparecieron a día +8 mientras que en el grupo tratado no se observaron hasta el día +17 y no en todos los animales (en tres de cinco). Esta diferencia entre ambos grupos se mantuvo hasta el final del estudio probablemente debido a la muerte celular inducida por el AcMo en las masas tumorales (**Figura 17-D-E**).

Por otro lado, y gracias a esta prueba de concepto, pudimos confirmar que el AcMo a estudio era también eficaz bloqueando la migración de las células tumorales hacia órganos linfoides primarios (OLP) como la MO, y OLS como el bazo (**Figura 17-F**). Los GL eran indetectables, en parte debido al estado de inmunodeficiencia de los animales y/o a que el periodo de seguimiento fue relativamente corto como para generar linfadenopatías prominentes. Cabe indicar que los animales de ambos grupos se sacrificaron en el día +27, día en el que todos los animales del grupo control presentaban ulceraciones o tumores >15mm. Del mismo modo, no se hallaron evidencias de metástasis en órganos no linfoides en ninguno de los dos grupos (datos no mostrados) lo que podría deberse a que el corto periodo de tiempo del experimento pudo dejar fuera del marco un proceso de invasión posterior.

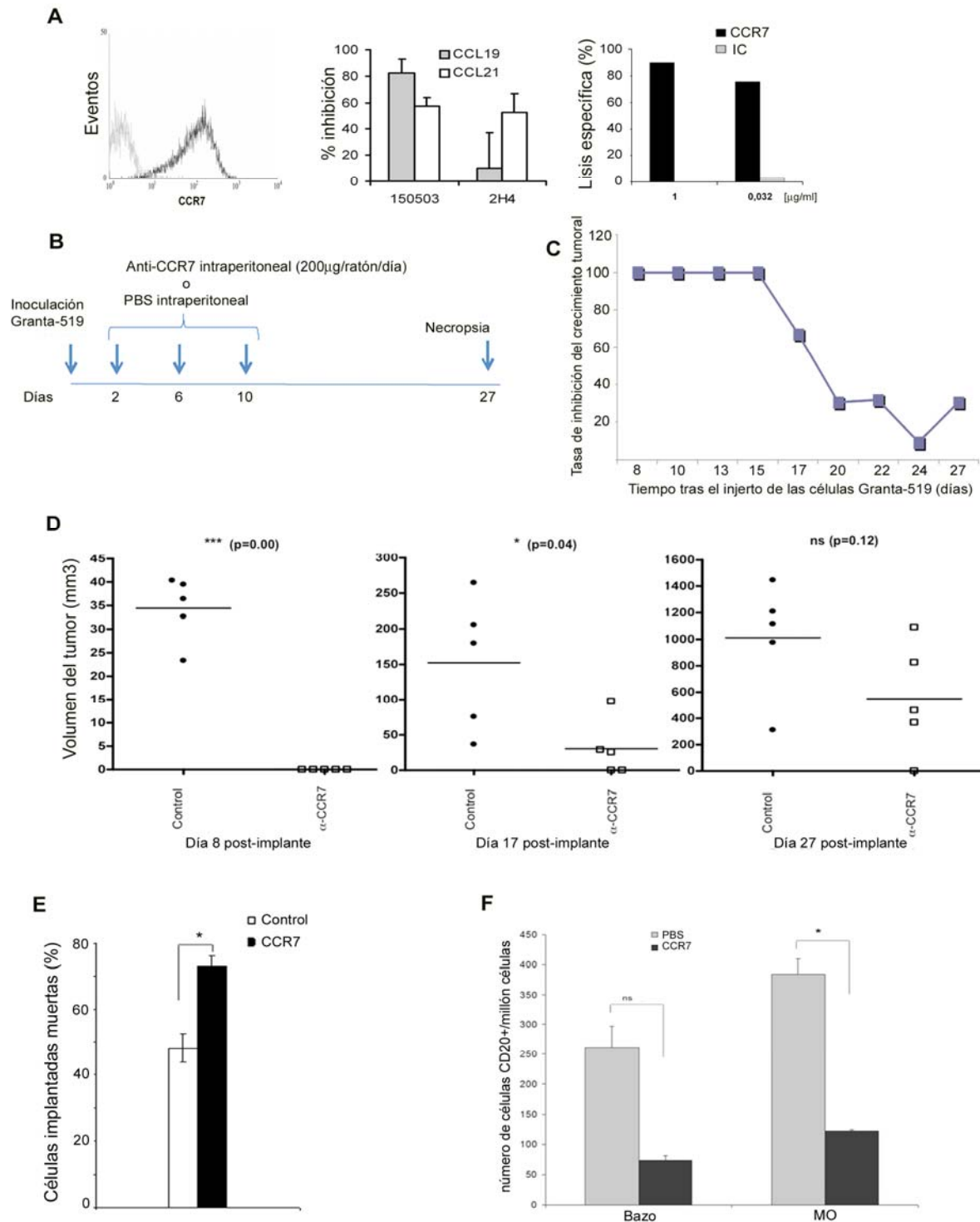


Figura 17. Eficacia terapéutica *in vivo* del AcMo contra CCR7 en un modelo subcutáneo de linfoma de célula del manto. A) Estudios de expresión de CCR7 y de los MDA del AcMo contra el receptor en células Granta-519. Se muestran la expresión de CCR7 analizada por CMF, la tasa de inhibición del AcMo sobre la migración de las células tumorales hacia los ligandos del receptor y la lisis específica inducida por CDC a dos concentraciones distintas del Ac. B) Protocolo del modelo. Las células Granta-519 se implantaron vía subcutánea en el flanco derecho de ratones SCID (n=10). El tratamiento con Ac (n=5) o PBS (n=5) vía intraperitoneal empezó el día +2 post-implante y continuó los días +6 y +10. C) El AcMo contra CCR7 reduce el crecimiento tumoral. La máxima tasa de inhibición se alcanzó dentro de las dos primeras semanas siguientes al tratamiento. D) Efectos del tratamiento en el volumen del tumor a días +8 (primeros tumores palpables), +17 y +27. E) El AcMo contra CCR7 induce muerte celular *in vivo* en células Granta-519. Se muestra el porcentaje de muerte en células Granta-519 recuperadas de los tumores subcutáneos de animales del grupo control o del grupo tratado. F) El AcMo reduce la infiltración de células de LCM en bazo y MO.

1.2.3. Eficacia terapéutica en pacientes de LLC de alto riesgo

Dentro de los pacientes de LLC, aquellos con *del17p* y/o LLC-RF son los que presentan mayores problemas clínicos y necesidades terapéuticas más urgentes. Las opciones terapéuticas son muy limitadas y en la actualidad van enfocadas al uso de agentes que actúen de forma independiente de la vía de P53, entre ellos los AcMo. Por ello decidimos evaluar *in vitro* la eficacia del AcMo contra CCR7 usado en monoterapia en muestras de estos pacientes.

Las células B de LLC-RF y/o con *del17p* expresan niveles elevados de CCR7

Con el fin de determinar si los pacientes de LLC de alto riesgo pueden beneficiarse de una terapia basada en el uso de un AcMo contra CCR7, lo primero que hicimos fue analizar la expresión en superficie de CCR7 y compararla con la expresión de CD52 y CD20, dianas respectivas de los AcMo terapéuticos alemtuzumab y rituximab. Veinte pacientes de LLC (**Tabla 6**) se distribuyeron en tres grupos experimentales y un grupo control: pacientes con LLC-RF y *del17p* (F/D); pacientes no tratados previamente con fludarabina y con la delección 17p (-/D); y pacientes con LLC-FR y ambas copias de *TP53* (F/-). En el grupo control se incluyeron pacientes no tratados y con citogenética normal (-/-). Pudimos observar que CCR7 se expresaba con niveles altos en las células de LLC sin diferencias entre los grupos estudiados excepto en el caso del grupo F/- que presentaba niveles de expresión 3 veces menores que el grupo control (**Figura 18-A**), aunque esta reducción se observaba también en el caso de CD52 y CD20. Aun así, los niveles de CCR7 eran mayores que los de las otras dos dianas. Curiosamente, los pacientes *naïve* a fludarabina y con *del17p* (grupo -/D) expresaban más CCR7 en superficie que los pacientes del grupo control, y aquellos del grupo F/D más que los del grupo F/- y similares al grupo control, lo que podría indicar alguna relación entre la presencia de *del17p* y mayores niveles de expresión de CCR7. Estos resultados confirmaban que la expresión de CCR7 era elevada en LLC de alto riesgo, en concreto en los portadores de la *del17p*, fueran o no refractarios a fludarabina. Para el caso de los pacientes sin *del17p* y con LLC-RF, aunque los niveles de superficie de CCR7 eran menores que los del grupo control, seguían siendo altos y, como veremos a continuación, cumplían con los requerimientos para el éxito de la inmunoterapia con el AcMo.

Las células T de LLC-RF y/o con *del17p* expresan niveles moderados de CCR7

Al considerar CCR7 como una potencial diana terapéutica, hay que tener en cuenta los posibles efectos adversos, especialmente los derivados de la depleción de ciertas poblaciones de células T. Cuando analizamos la expresión de CCR7 en las células T de los mismos pacientes observamos que los niveles eran similares en el grupo control y en el grupo -/D (**Figura 18-B**). Como ocurría con las células de LLC, la expresión de CCR7 se encontraba disminuida en células T de pacientes tratados con fludarabina. Salvo en el grupo control, las células T mostraban de forma estadísticamente significativa una mayor expresión de CD52 que de CCR7, aunque hay que señalar que en el grupo control los niveles de expresión de CCR7 también eran menores que los de CD52. Esta expresión elevada de CD52 explica la inmunosupresión T asociada al tratamiento con

alemtuzumab y que limita su uso. En todos los grupos, la expresión de CCR7 se distribuía de forma bimodal debido a la presencia de células T CCR7⁺ (células T *naïve*, células TMC y células Treg) y células T CCR7⁻ (células T efectoras y de memoria efectora) (**Figura 18-C**).

Paciente	Esta- dio Rai	<i>del 17p</i> (FISH)	FR	FAR	Otras alteraciones citogenéticas (FISH)	Tratamiento previo	CDC	% de lisis en células	% de lisis en células
								B tras el tratamiento	B tras el tratamiento
								con 5 µg/ml de Ac contra CCR7 o alemtuzumab	con 0,5 µg/ml de Ac contra CCR7 o alemtuzumab
1	I	y	n		<i>del 13q</i>	t (1)	y	97,80 vs 92,45	93,64 vs 83,16
2	0	y	n			ut	y	94,27 vs 89,70	94,45 vs 81,64
3	III	n	n			t (1)	n	nd	nd
4	IV	n	y			t (2)	y	98,66 vs 92,24	93,35 vs 83,26
5	IV	n	y			t (5)	y	97,96 vs 96,62	72,36 vs 77,40
6	O	y	n			ut	y	96,94 vs 76,10	97,08 vs 17,16
7	I	y	n			t (1)	y	96,84 vs 16,69	91,27 vs 0
8	III	n	n			t (1)	n	nd	nd
9	IV	y	n			t (1)	y	87,82 vs 74,95	87,94 vs 5,18
10	IV	y	y	y	<i>de l 11q</i>	t (5)	y	99,06 vs 66,42	99,06 vs 12,83
11	IV	y	y			t (4)	y	97,50 vs 92,76	90,84 vs 69,04
12	IV	n	y		<i>del 11q</i>	t (2)	y	91,06 vs 39,24	82,13 vs 30,62
13	IV	y	y		<i>del 11q,del13q</i>	t (4)	y	83,31 vs 53,87	63,18 vs 27,73
14	IV	y	y	y	<i>del 11q</i>	t (3)	y	94,55 vs 48,94	94,54 vs 33,37
15	0	n	n			t (1)	n	nd	nd
16	IV	n	y		<i>del 11q</i>	t (2)	y	99,14 vs 96,98	86,72 vs 74,01
17	I	y	n		<i>del 13q</i>	t (1)	y	98,97 vs 83,29	98,52 vs 39,12
18	I	n	n			ut	n	nd	nd
19	IV	y	y			t (4)	y	82,04 vs 63,29	80,02 vs 18,45
20	0	n	n			ut	n	nd	nd
21	I	n	n			ut	n	nd	nd
22	0	n	n			ut	n	nd	nd
23	0	na	n			ut	n	nd	nd

Tabla 6. Características de las muestras analizadas de pacientes de LLC de alto riesgo. Se enumeran las anomalías citogenéticas y el estado de resistencia de los pacientes estudiados así como la actividad CDC mediada por el AcMo contra CCR7 o contra CD52 (alemtuzumab). FR, LLC refractaria a fludarabina; FAR, LLC refractaria a fludarabina y alemtuzumab. FISH, hibridación fluorescente *in situ*; CDC, citotoxicidad dependiente de complemento; y, sí; n, no; na, no disponible; nd, no determinado; ut, no tratado; t, tratado (número de líneas).

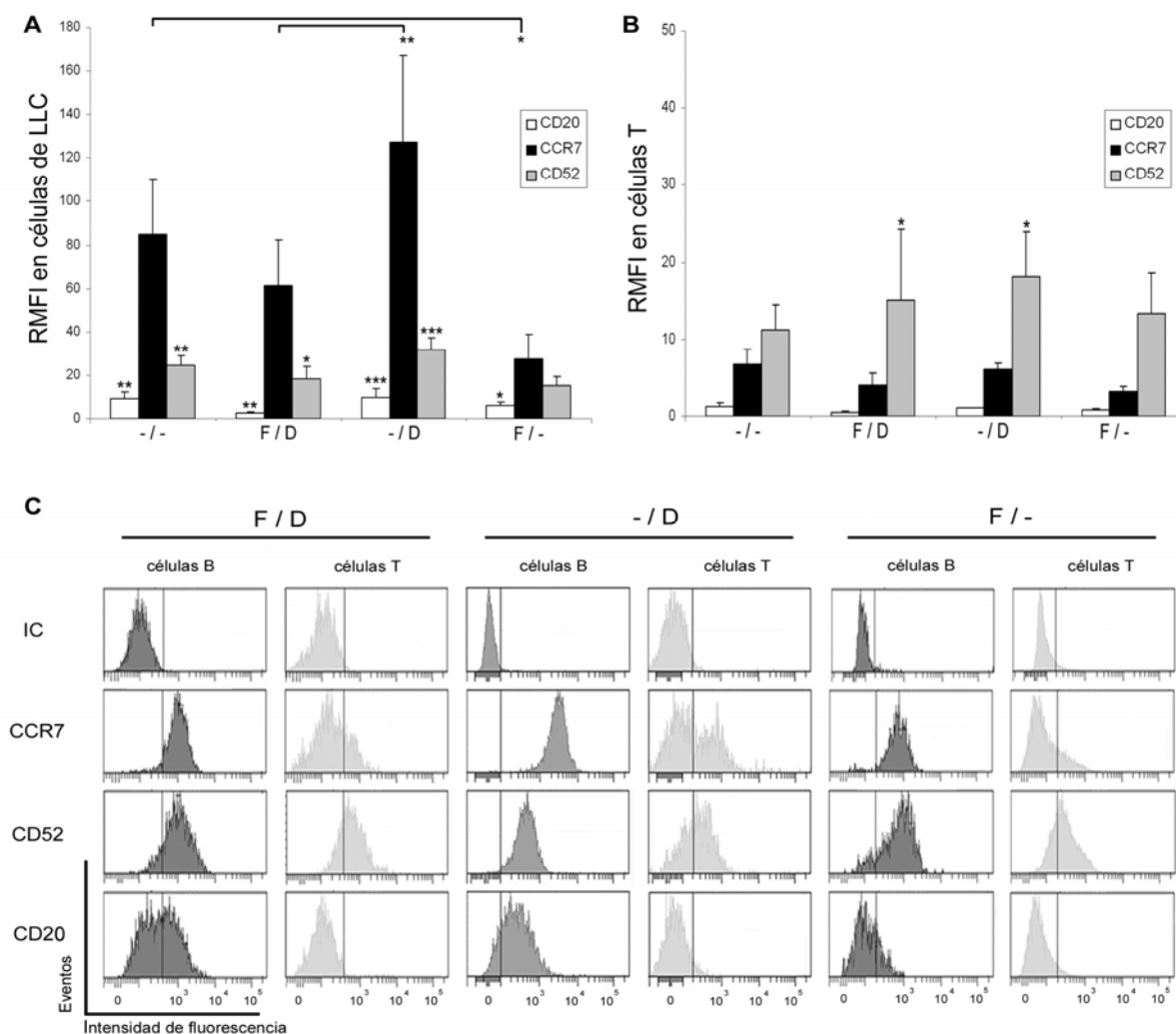


Figura 18. Expresión en superficie de CCR7 en LLC con *del17p* y/o refractaria a fludarabina. A) Intensidad mediana de fluorescencia relativa (RMFI) de CCR7, CD20 y CD52 en células de LLC (n=20). Los pacientes se distribuyeron en cuatro grupos según su perfil citogenético y la sensibilidad a fludarabina: -/-, citogenética normal y sin tratamiento previo (n=5); F/D, pacientes con LLC-RF y *del17p* (n=5); -/D, pacientes no tratados con fludarabina y con *del17p* (n=6); F/-, pacientes refractarios a fludarabina y sin *del17p* (n=4). B) RMFI en células T de las mismas muestras. C) Histogramas de frecuencia mostrando CCR7, CD20 y CD52 en un paciente representativo de cada grupo.

El AcMo contra CCR7 media una CDC potente y específica en LLC-RF y/o con *del17p*

Una vez visto que las células de LLC de alto riesgo expresaban niveles elevados de CCR7 quisimos comprobar si la CDC era un mecanismo efector eficaz eliminando dichas células o si, por el contrario, éstas eran resistentes. El AcMo terapéutico alemtuzumab se eligió como referencia pues es el Ac con mayor eficacia en estos grupos de pacientes¹²⁴. En los tres grupos de pacientes, el uso de AcMo contra CCR7 mostró una elevada citotoxicidad dependiente de complemento (**Figura 19-A-C-E**). Las mejores respuestas *in vitro* se observaron en los pacientes de LLC con *del17p* y *naïve* a fludarabina (-/D). Dado que estos pacientes mostraban los niveles de expresión más altos de CCR7 (**Figura 18**) no extraña que los porcentajes de lisis específica en células patológicas rondaran el 100% en rangos de concentración de 5 a 0.5 µg/ml del Ac contra CCR7 (**Figura 19-C**). Por último, y a pesar de que los pacientes con enfermedad refractaria a fludarabina y sin delección de *P53* (F/-)

mostraban los niveles de expresión más bajos para CCR7 (**Figura 18**), los AcMo contra CCR7 también presentaron una elevada actividad citotóxica en este grupo (**Figura 19-E**). Curiosamente, en este grupo, la muerte basal causada por un Ac irrelevante era mayor que en el resto de grupos, probablemente debido a una mayor susceptibilidad a lisis inespecífica originada por numerosos tratamientos previos.

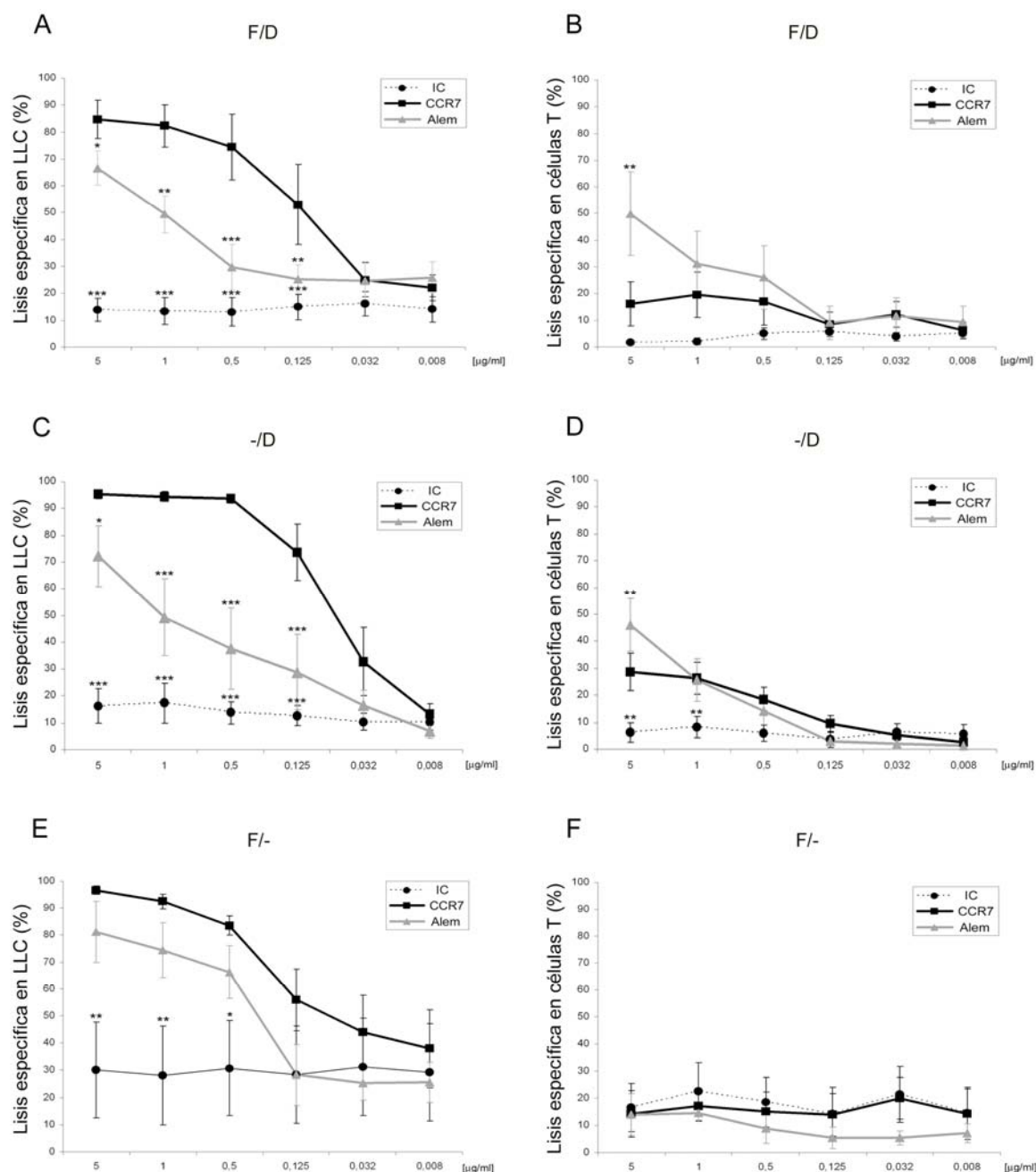


Figura 19. Los Ac contra CCR7 median una potente CDC en células de LLC-RF y/o con *del17p*. Los PBMC de pacientes se incubaron con dosis decrecientes de AcMo contra CCR7, CD52 (alemtuzumab, Alem) o un IC (control de isotipo) a las concentraciones indicadas y luego se expusieron a complemento de conejo durante hora y media. A-B) Células de LLC y células T de pacientes con enfermedad RF y *del17p*, F/D (n=5). C-D) Células de pacientes con *del17p* y *naïve* a fludarabina, -/D (n=6). E-F) células de pacientes sin *del17p* pero refractarios a fludarabina, F/- (n=4).

Al analizar el efecto de ambos AcMo en las células T de estos grupos de pacientes pudimos observar cómo la CDC mediada por alemtuzumab era mayor que la mediada por el Ac contra CCR7 (**Figura 19-B-D-F**), lo que es un punto importante a tener en cuenta a la hora de considerar potenciales toxicidades de la terapia con AcMo contra CCR7. Por último, señalar que ningún Ac tuvo actividad en las células T del grupo de pacientes (F/-) (**Figura 19-F**). En el caso del Ac contra CCR7 esta situación se daba también en el grupo (F/D), y se puede explicar por los bajos niveles de CCR7 observados en células T (**Figura 18**). En el caso de alemtuzumab, esta situación llama la atención si se tiene en cuenta que los niveles de CD52 eran parecidos entre los diferentes grupos analizados (**Figura 18**), y puede deberse a algún mecanismo de resistencia contra dicho Ac.

El AcMo contra CCR7 es eficaz en células de LLC refractaria a fludarabina y alemtuzumab (FAR)

La LLC-FAR presenta muy mal pronóstico siendo el número de terapias disponibles para esta clase extremadamente limitado ¹⁹⁸. De nuestra cohorte, los pacientes 10 y 14 (Tabla 6) estaban catalogados como FAR y ambos presentaban un perfil citogenético adverso con del17p y del11q. Por ello, estudiamos el potencial terapéutico de los AcMo contra CCR7 en este grupo analizando a ambos pacientes (**Figura 20**). En los dos casos, la lisis específica con alemtuzumab era parecida a la del control de isotipo, excepto a dosis saturantes. Por el contrario, la actividad del Ac contra CCR7 era claramente superior a la de alemtuzumab en la mayoría de las dosis testadas.

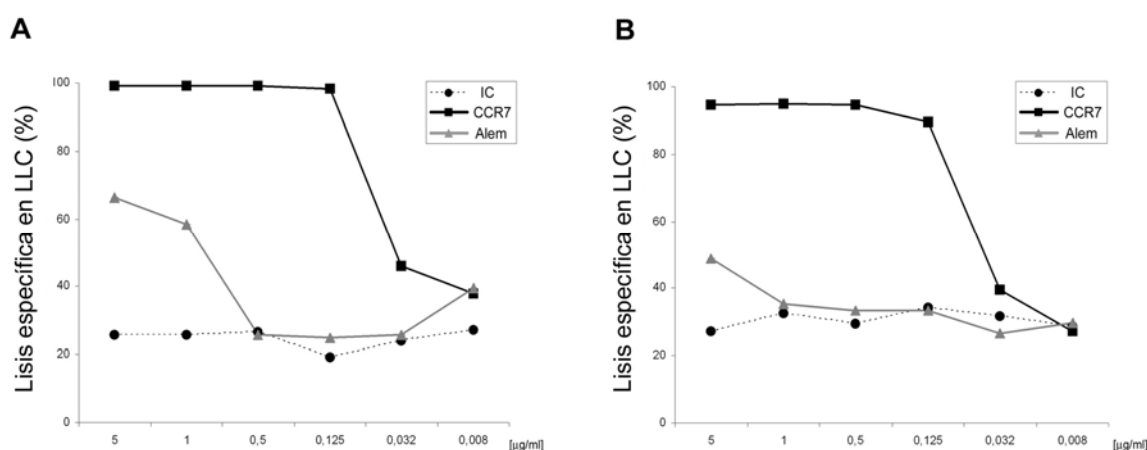


Figura 20. La CDC mediada por Ac contra CCR7 es eficaz en LLC-FAR. Lisis específica de células de los pacientes 10 (A) y 14 (B). IC, control de isotipo; Alem, alemtuzumab (anti-CD52).

Los AcMo contra CCR7 median una CDC moderada en células B sanas

Para completar la evaluación de los potenciales efectos adversos no deseados de la terapia con Ac contra CCR7, analizamos si el Ac afectaba a las células B sanas CCR7⁺. Como se observa en la **Figura 11**, los niveles de superficie de CCR7 son menores en células B normales que en células de LLC. Por el contrario, la RMFI para CD52 es aproximadamente 5 veces mayor que en el caso de

CCR7 (**Figura 21-A-B**) lo que explica la elevada actividad citotóxica mediada por complemento que inducen los Ac contra CD52 en células B sanas y muy superiores a las obtenidas con Ac contra CCR7 (**Figura 21-C**). Estos resultados confirmaban la relación positiva entre eficacia de los Ac contra CCR7 mediando CDC y los niveles de superficie del receptor, y apuntaban, una vez más, hacia una baja toxicidad potencial asociada a la terapia con este tipo de Ac.

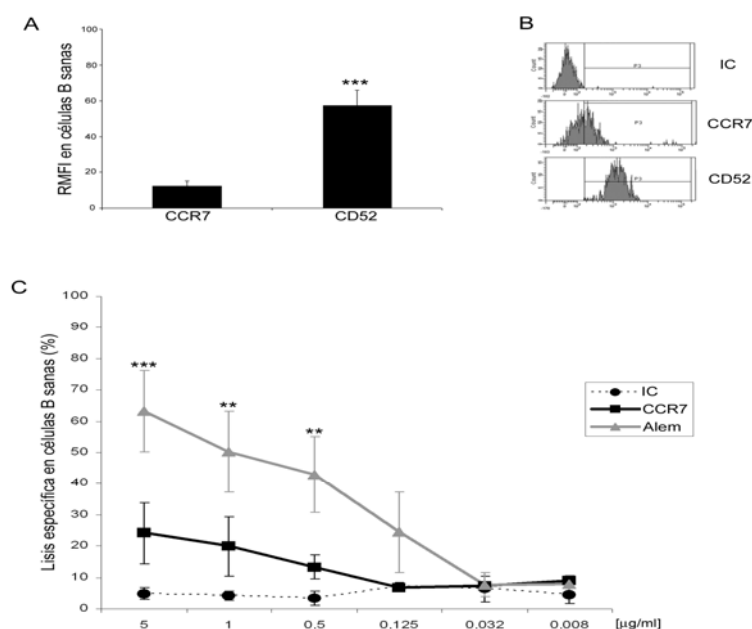


Figura 21. Los Ac contra CCR7 median una moderada CDC contra células B de donantes sanos. A) RMFI en células B CD19⁺ (n=6). B) Histogramas de frecuencia representativos mostrando CCR7 y CD52 de un donante sano. C) Lisis específica de células B de donantes sanos (n=4). IC, control de isotipo; Alem, alemtuzumab (anti-CD52).

Los niveles de expresión de CCR7 son elevados tanto en pacientes de LLC no tratados como en los muy tratados

Las células de pacientes de alto riesgo expresan altos niveles de superficie de CCR7. Como estos pacientes reciben una gran cantidad de tratamientos diferentes, quisimos comprobar si esos niveles de expresión se mantenían en pacientes muy tratados. Para ello, analizamos la expresión de CCR7 en pacientes de LLC no tratados, en pacientes que hubieran recibido sólo una línea de tratamiento y en pacientes que hubieran recibido dos o más terapias diferentes. Como se muestra en la **Figura 22-A**, los niveles de superficie eran altos, tanto en pacientes no tratados (UT) como en los pacientes tratados (T), independientemente del tipo de tratamiento previo. En ambos grupos (UT y T), la densidad de CCR7 en superficie era significativamente mayor que la de CD20 y CD52, mientras que no se observaron diferencias estadísticas para CCR7 entre ambos grupos. Los pacientes que habían recibido más tratamientos (tres, cuatro o cinco líneas), mostraban reducción en los niveles del receptor en superficie, sin embargo, esta reducción no era exclusiva de CCR7 observándose también para CD20 y CD52 (**Figura 22-B**). Recordemos que el uso de fludarabina, por ejemplo, se asociaba a

reducción de niveles de CCR7, CD20 y CD52 (**Figura 18**). Además, nuestros resultados mostraban cómo la proporción de células CCR7⁺ era muy homogénea tras las diferentes líneas de tratamiento utilizadas, independientemente del repertorio terapéutico empleado. Si nos fijamos en los porcentajes de células de LLC positivas para CCR7 y CD52, no se observaban diferencias en los pacientes no tratados y en aquellos que habían recibido sólo una línea de tratamiento (**Figura 22-C**), pero en el caso de los pacientes tratados con tres o más líneas de tratamiento los porcentajes de células CCR7⁺ se mantenían en torno al 100% en todos los pacientes, mientras que los porcentajes de células CD52⁺ disminuían en varios pacientes a valores cercanos al 85%. Recordemos que la presencia de células negativas para un marcador dado puede ser origen de futuras resistencias, lo que corrobora el uso de CCR7 como diana terapéutica.

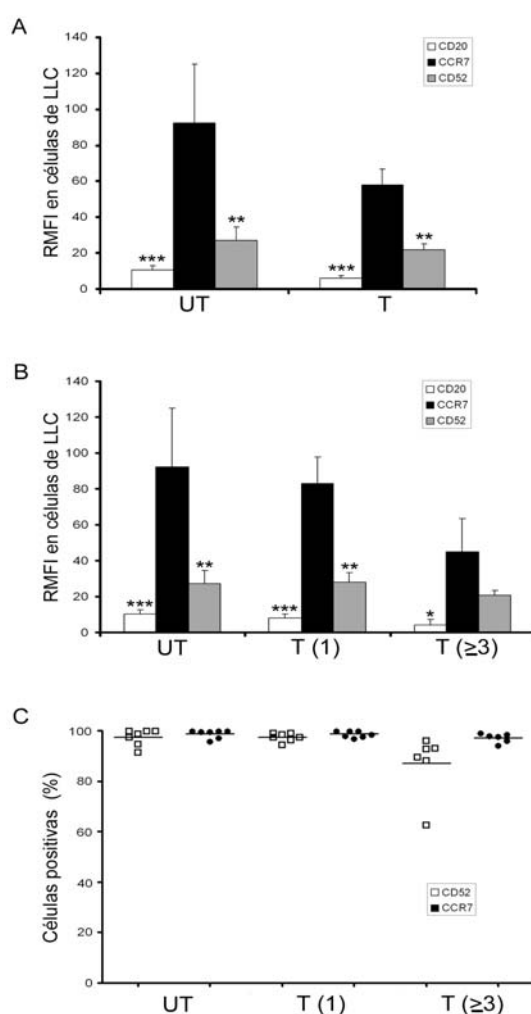


Figura 22. Niveles de expresión de CCR7 en pacientes de LLC muy tratados. A) RMFI en pacientes no tratados (UT, n=7) o tratados (T, n=13). B) Los niveles de CCR7 son altos en pacientes muy tratados. Los pacientes se clasificaron según el número de líneas de tratamiento recibidas: UT, no tratados (n=7); T(1), pacientes tratados con una línea (n=7); T(≥3), pacientes tratados con 3 o más líneas (n=6). C) La proporción de células CCR7⁺ se mantiene a lo largo de las diferentes líneas de tratamiento.

2. CCR7 como diana terapéutica en otros desórdenes linfoproliferativos

2.1. Terapia con AcMo dirigidos contra CCR7 en LPLT

Una vez tuvimos caracterizados los MDA de los Ac contra CCR7 y corroborado el potencial terapéutico de un AcMo dirigido contra CCR7 en LLC, decidimos validar la diana y el Ac demostrando su eficacia en otras enfermedades consideradas dianas potenciales para el Ac. Como se ha indicado previamente, la LPLT es una enfermedad huérfana de linaje T de la que sabemos muy poco y que actualmente se trata con agentes no licenciados para el tratamiento específico de la LPLT, lo que en parte puede explicar las reducidas tasas de éxito.

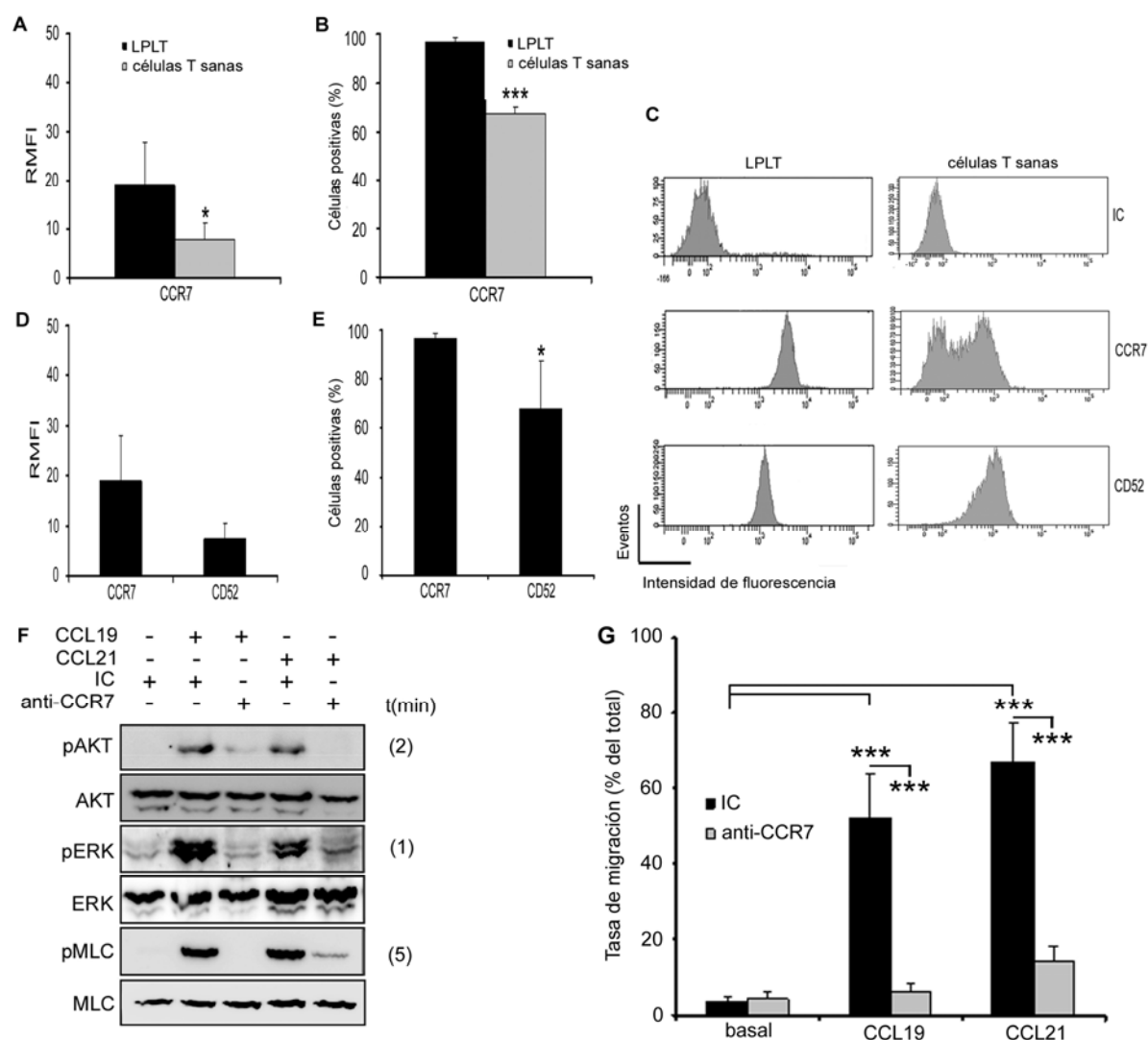


Figura 23. Las células de LPLT expresan un CCR7 funcional. A) RMFI en células de LPLT (n=5) y células T sanas (n=5). B) Proporción de células CCR7⁺ en los mismos pacientes o donantes sanos. C) Histograma de frecuencia mostrando el perfil de expresión e intensidad de CCR7 y CD52 en células T de un paciente y un donante sano representativos. D) Niveles de superficie de CCR7 y CD52 en células de LPLT. E) Proporción de células CCR7⁺ y CD52⁺ en células de LPLT. F) El AcMo contra CCR7 (10 µg/ml) bloquea la activación y señalización mediada por CCR7 en células de LPLT. G) El AcMo contra CCR7 (10µg/ml) bloquea la migración mediada por CCR7 en células de LPLT (n=5). IC, control de isotipo.

2.1.1. Caracterización *in vitro* del MDA del AcMo

Al igual que en LLC, la caracterización funcional del Ac en LPLT ha incluido estudios *in vitro* dirigidos a determinar aspectos relacionados con la función mediada por la región Fab, entre otros, bloqueo de la migración, de la proliferación o la supervivencia, y funciones asociadas a la región Fc tales como la inducción de ADCC o la CDC.

CCR7 es un receptor funcional que se expresa en células de LPLT

Como ocurre con la LLC, la LPLT se caracteriza por un patrón de infiltración diseminado que afecta sobre todo a OLS, MO y SP. Sin embargo, cuando consideramos la enfermedad como diana potencial del Ac se desconocía si las células leucémicas expresaban o no el receptor CCR7. Por ello, lo primero que hicimos fue analizar la expresión del receptor en muestras de pacientes de esta patología y pudimos observar que la expresión de CCR7 era mucho mayor que en células sanas (aproximadamente el doble) y que estaba presente en aproximadamente el 100% de las células tumorales (**Figura 23-A-B-C**). Al comparar estos datos con los obtenidos con la diana de alemtuzumab (CD52), el único AcMo con eficacia terapéutica en esta patología, los niveles de CCR7 eran 2.5 veces mayores que los de CD52 y la proporción de células CCR7⁺ era más homogénea y cercana al 100% (**Figura 23-C-D-E**). Como ocurría en LLC, el receptor CCR7 era completamente funcional en células de LPLT señalizando a través de las mismas vías que habíamos estudiado en LLC (**Figura 23-F**) e induciendo migración hacia los ligandos del receptor (**Figura 23-G**). Como se aprecia en la **Figura 23-F-G**, las cascadas de MEK/ERK1/2, PI3K/AKT y RhoA/ROCK/MLC se activaban tras la unión de CCR7 a sus ligandos, siguiendo una cinética similar a la observada en LLC. Ambos procesos, de señalización y migración, se inhibían con el uso del Ac a estudio.

El Ac contra CCR7 bloquea la invasión y migración transendotelial

En células de LLC, los ligandos de CCR7 inducen la secreción de metaloproteínas de la matriz (MMPs) de la familia de las gelatinasas ¹²⁹. En LPLT, los ensayos de zimografía en gelatina que llevamos a cabo mostraron una secreción constitutiva de MMP-9 pero no de MMP-2. Dicha secreción de MMP-9 aumentaba con la adición de los ligandos de CCR7, y era específicamente inhibida con el uso del Ac contra CCR7 (**Figura 24-A-B**). La MMP-2 no se secretaba tampoco en presencia de CCL19 o CCL21. Se sabe que la liberación de MMP-9 conlleva degradación de la MEC y de la membrana basal lo que puede facilitar procesos de invasión y metástasis. Por este motivo realizamos experimentos de invasión inducida por CK en cámaras de Transwell rellenas con Matrigel. Con ambos ligandos, el número de células de LPLT invasivas aumentó con respecto al estado basal (**Figura 24-C**), aunque la invasión mediada por CCL19 parecía ser más importante. Con cualquiera de los ligandos, la invasión se veía completamente inhibida con el uso del Ac contra CCR7. Resultados similares se observaron en la migración inducida por CCR7 a través de endotelio (TEM) (**Figura 24-D**) aunque en esta ocasión la migración hacia CCL21 mostraba valores más altos. Esto puede ser debido a que CCL21 es inmovilizada sobre las células del endotelio a través de un dominio

de unión a heparina presente en su extremo C-terminal que une glucosaminoglicanos o proteoglicanos facilitando la formación de un gradiente ¹⁹⁹.

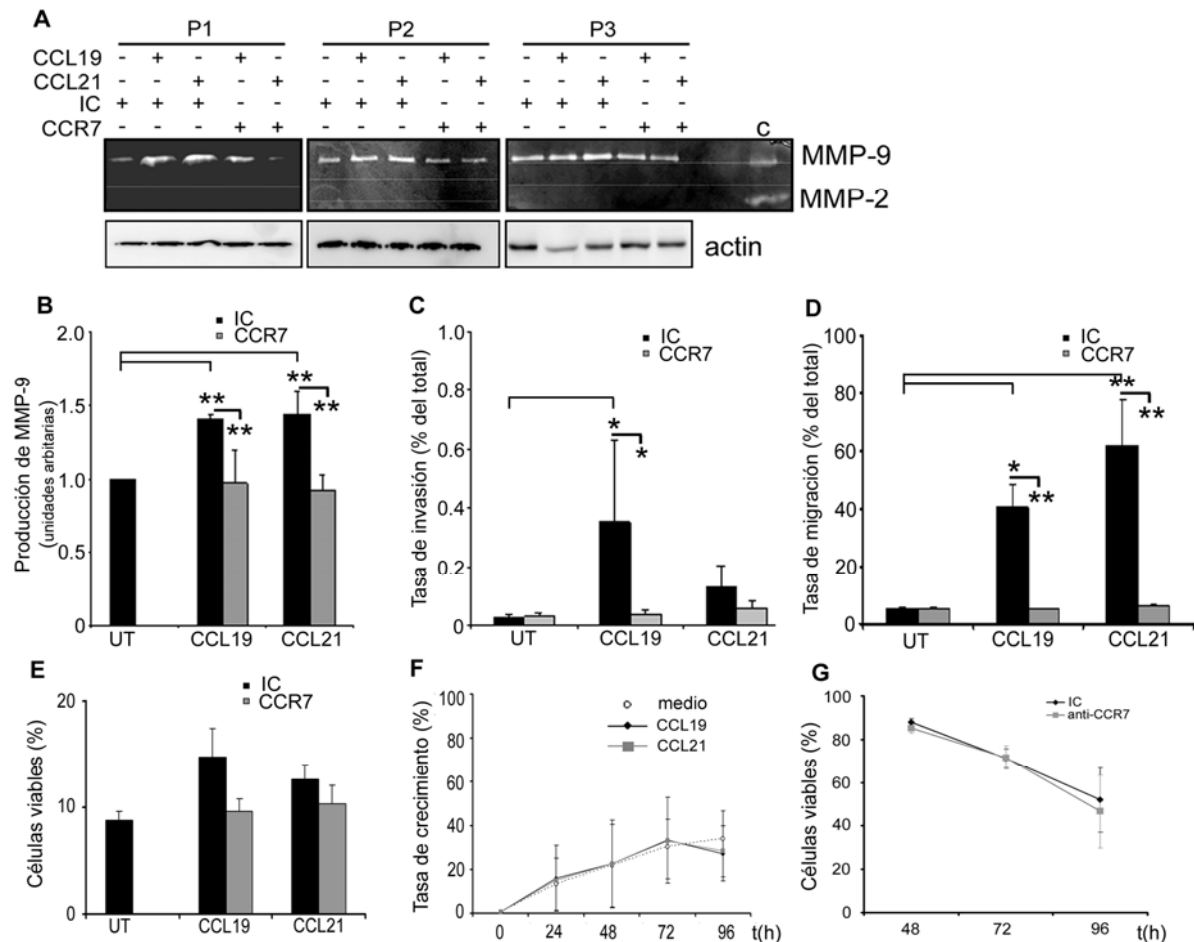


Figura 24. En células de LPLT el bloqueo de CCR7 afecta a la invasión, la migración a través de endotelio y a la supervivencia inducidas por los ligandos del receptor. A) La activación de CCR7 aumenta la secreción de MMP-9 en células de LPLT obtenidas de 3 pacientes diferentes (P1, P2, P3) y es inhibida con el uso del Ac contra CCR7. IC, control de isotipo; C, FBS usado como control positivo. B) Cuantificación de la secreción de MMP-9. UT, no tratado con ligando (n=3). C) CCL19 y CCL21 dirigen la invasión mediada por CCR7 en LPLT (n=4). UT, células no tratadas con CK. D) CCR7 media la migración de células de LPLT a través del endotelio (n=4). E) los ligandos de CCR7 aumentan la supervivencia de células de LPLT. Células de 4 pacientes fueron incubadas durante 144 horas con los ligandos de CCR7. Se muestra el porcentaje de células viables a 144 horas. F) Los ligandos de CCR7 no inducen proliferación en células de LPLT. G) El AcMo contra CCR7 no induce apoptosis de forma directa sobre las células de LPLT.

El AcMo contra CCR7 bloquea señales de supervivencia mediadas por CCR7

También quisimos estudiar si junto con su papel en migración, el par CCR7-ligando podía estar implicado en la inducción de supervivencia celular y proliferación de las células de LPLT, y de ser así, si otro de los MDA mediados por la región Fab consistía en el bloqueo de dichas funciones celulares. Pudimos constatar que en LPLT el receptor CCR7 confiere cierta resistencia a la muerte celular espontánea en cultivos a largo plazo (**Figura 24-E**) no teniendo, por el contrario, efectos aparentes en proliferación (**Figura 24-F**). Dado que los Ac contra CCR7 usados no indujeron muerte celular de forma directa sobre las células leucémicas (**Figura 24-G**), pudimos corroborar que la

muerte celular observada en los cultivos a largo plazo se debía a un efecto indirecto derivado del bloqueo de las señales de supervivencia generadas por los ligandos del receptor.

2.1.2. Evaluación *in vivo* de la eficacia terapéutica del AcMo

En la actualidad existen dos modelos murinos de LPLT basados, respectivamente, en la sobreexpresión de los oncogenes *TCL-1* y *MTCP-1*^{148,149}. Como ocurría en LLC, estos modelos no nos eran útiles para caracterizar *in vivo* la eficacia de los Ac contra CCR7 ya que el Ac no reconoce el receptor murino. Tampoco había datos publicados (y no los hay en la actualidad) que indicasen la viabilidad de xenotrasplantar líneas o células primarias. Por ello, decidimos injertar células primarias obtenidas de pacientes de LPLT. A pesar de haber llevado a cabo numerosos intentos en ratones con distinto fondo genético, en ninguno de los casos hemos conseguido desarrollar un modelo útil de estudio. Por ello decidimos probar modelos ya establecidos consistentes en el injerto de células primarias procedentes de pacientes con leucemia aguda linfoblástica T (LAL-T) en ratones Rag2-/-gammac-/- . Esta cepa mantiene la actividad del complemento y muestra cierta actividad de las células de la inmunidad innata¹³⁶.

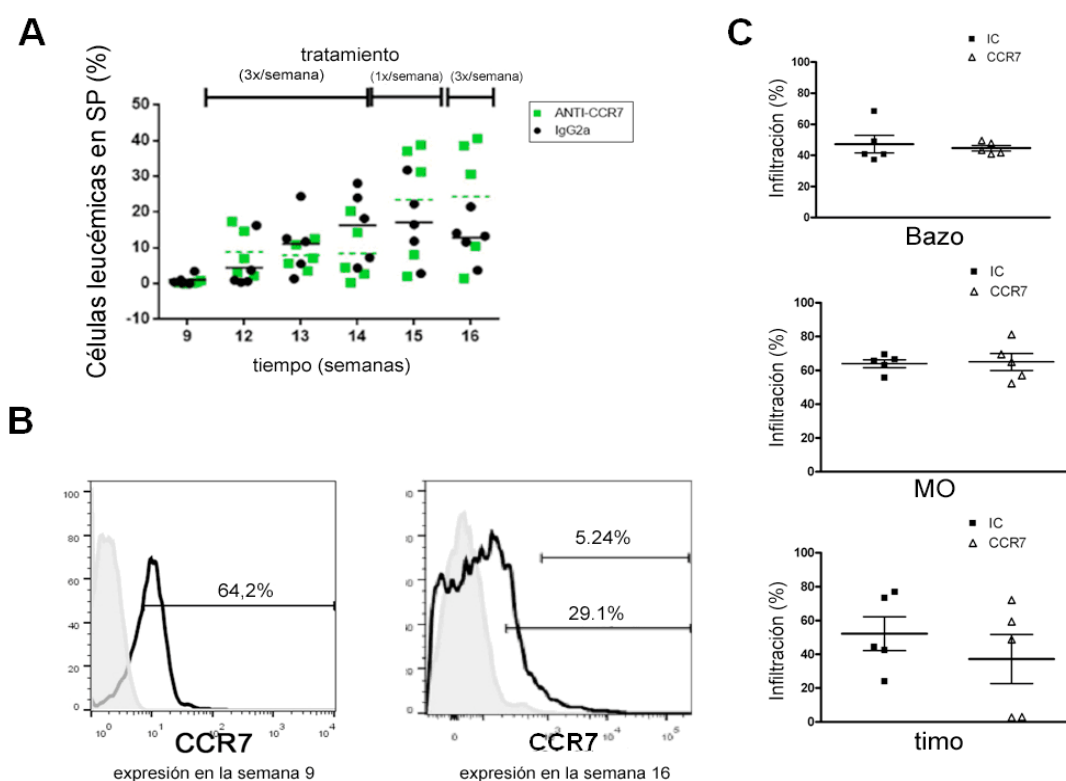


Figura 25. Prueba de eficacia terapéutica *in vivo* del AcMo contra CCR7 en un modelo de LAL-T consistente en injerto de células primarias en ratones Rag2-/-. A) Porcentaje de células tumorales en SP de los animales control (IgG2a, n=5) y tratados (CCR7, n=5). Se indica el momento en el que comienza el tratamiento y la posología del mismo. B) Histograma de frecuencias mostrando la expresión de CCR7 en células leucémicas en el momento del injerto y en células extraídas a animales del grupo control en la semana 16. C) Porcentajes de infiltración de células leucémicas en bazo, MO y timo. IC, control de isotipo IgG2a.

Para desarrollar el xenoinjerto elegimos la muestra de un paciente con un alto porcentaje de células leucémicas CCR7⁺ y elevados niveles de expresión del receptor. A las 9 semanas post-injerto, pudimos detectar las primeras células tumorales en SP (**Figura 25-A**) y empezamos con el tratamiento consistente en tres dosis semanales de 200 µg de Ac contra CCR7 o un IC. Tras 6 semanas de tratamiento, no observábamos efecto del tratamiento en SP por lo que decidimos analizar la expresión de CCR7 en las células injertadas y presentes en SP. Para ello, recolectamos la SP de los animales del grupo tratado con el control de isotipo por dos motivos: primero, porque el clon conjugado a fluorocromo del que disponíamos para marcar las células era el mismo que el purificado usado en el modelo, y por tanto, competirían por el epítipo de unión. Segundo, para poder descartar, en caso de negatividad, el efecto de una posible presión selectiva a favor de las células CCR7 negativas. Como se observa en la **Figura 25-B**, las células en el grupo control habían perdido la expresión de CCR7 por lo que decidimos concluir el estudio. Los análisis de bazo, MO y timo confirmaron la falta de efecto del Ac (**Figura 25-C**). Puede que la expresión de CCR7 esté determinada por el fondo genético del animal y/o alteraciones en el microambiente de OLP y/o OLS, por ello en la actualidad estamos trabajando en nuevos modelos comprobando que las células no pierdan expresión del receptor una vez injertadas. Uno de estos modelos consiste en el xenoinjerto de células de la línea SUPT-11 ya que esta línea muestra las alteraciones citogenéticas más frecuentes en LPLT, entre ellas traslocaciones entre los cromosomas 14 con puntos de rotura en q11 y q32 y anomalías en el cromosoma 8^{144,149}.

2.1.3. Eficacia terapéutica en pacientes de LPLT de alto riesgo

Una vez estudiadas en LPLT las funciones independientes de Fc, quisimos corroborar que las actividades citotóxicas adicionales derivadas de la unión de células o proteínas inmunitarias a través de su región Fc, eran eficaces en muestras de pacientes.

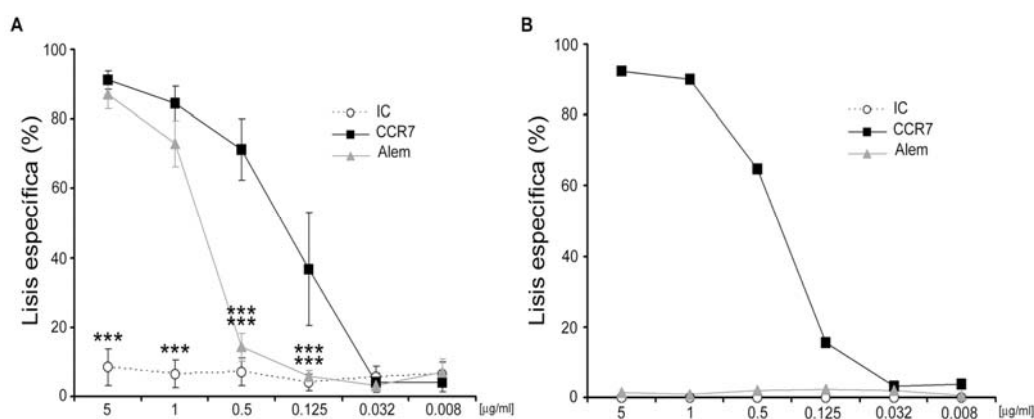


Figura 26. El AcMo contra CCR7 media una CDC muy efectiva en células de LPLT. A) Pacientes no tratados previamente con alemtuzumab (n=4). B) Paciente en recaída con resistencia a alemtuzumab y pérdida de expresión de CD52. Alem, alemtuzumab (anti-CD52); IC, control de isotipo.

Cuando testamos *in vitro* algunos mecanismos efectores mediados por la región Fc, pudimos comprobar que, al igual que en LLC, el Ac inducían un potente actividad CDC (**Figura 26**) y del mismo modo, los mecanismos dependientes de células, como la ADCC o la ADCP tenían poca o ninguna relevancia (datos no mostrados). Como se muestra en la **Figura 26**, los Ac contra CCR7 eran muy efectivos contra células de LPLT obtenidas de pacientes no tratados así como en células extraídas a un paciente multitratado, en recaída y refractario a alemtuzumab con citogenética adversa y expresión del factor pronóstico negativo TCL-1.

3. CCR7 como diana terapéutica en tumores de origen epitelial

3.1. Caracterización *in vitro* del MDA del AcMo

El Ac contra CCR7 neutraliza la formación de estructuras corticales ricas en actina necesarias para migración e invasión

En células tumorales móviles e invasivas, la cortactina promueve y estabiliza redes corticales de actina, como aquellas presentes en los *lamellipodia* e *invadopodia*, a través de Arp2/3^{200,201}. Los *lamellipodia* son extensiones finas y planas de la membrana situados en el frente de avance de la célula, que contienen filamentos de actina polarizados formando redes ortogonales donde la cortactina es un componente principal que regula la formación y persistencia de dichas estructuras, lo que facilita la migración en respuesta a ligandos extracelulares que señalizan a través de receptores transmembrana²⁰⁰. Para determinar si la activación de CCR7 inducía translocación de cortactina a los *lamellipodia*, realizamos estudios de microscopía en células de adenocarcinoma mamario MCF-7 (**Figura 27-A-B-C**). Pudimos observar cómo antes del estímulo la cortactina se ubicaba predominantemente en estructuras puntiformes en la zona perinuclear/Golgi y cómo la activación de CCR7 inducía una translocación rápida y transitoria de cortactina a la periferia donde se acumulaba en los *lamellipodia*. También pudimos comprobar que este proceso se veía afectado por el uso del AcMo contra CCR7 (**Figura 27-B-C**).

La cortactina también es una molécula importante en el desarrollo de *invadopodia*^{201,202}, jugando un papel central en la invasión celular del CM. Los *invadopodia* son protuberancias ventrales ricas en actina y cortactina que degradan la MEC favoreciendo la invasión celular²⁰³. Para comprobar si la señalización de CCR7 también estaba implicada en la formación de estas estructuras se cultivaron células MCF-7 en cristal con el fin de estudiar la formación de *invadopodia* en estadio I y II. En células de CM crecidas en cristal (sin matriz), dichos estadios se caracterizan por la acumulación de cortactina y actina durante los primeros minutos post-estímulo²⁰². Nuestros resultados mostraban cómo el número de células con *invadopodia* en estadios I y II era relativamente elevado en condiciones basales y cómo la proporción aumentaba aproximadamente 2 veces en células estimuladas con CCL19 y 1.5 veces en el caso de CCL21. Como era de esperar, el efecto observado era neutralizado con el uso del AcMo antagonista de CCR7 (**Figura 27-D-E**).

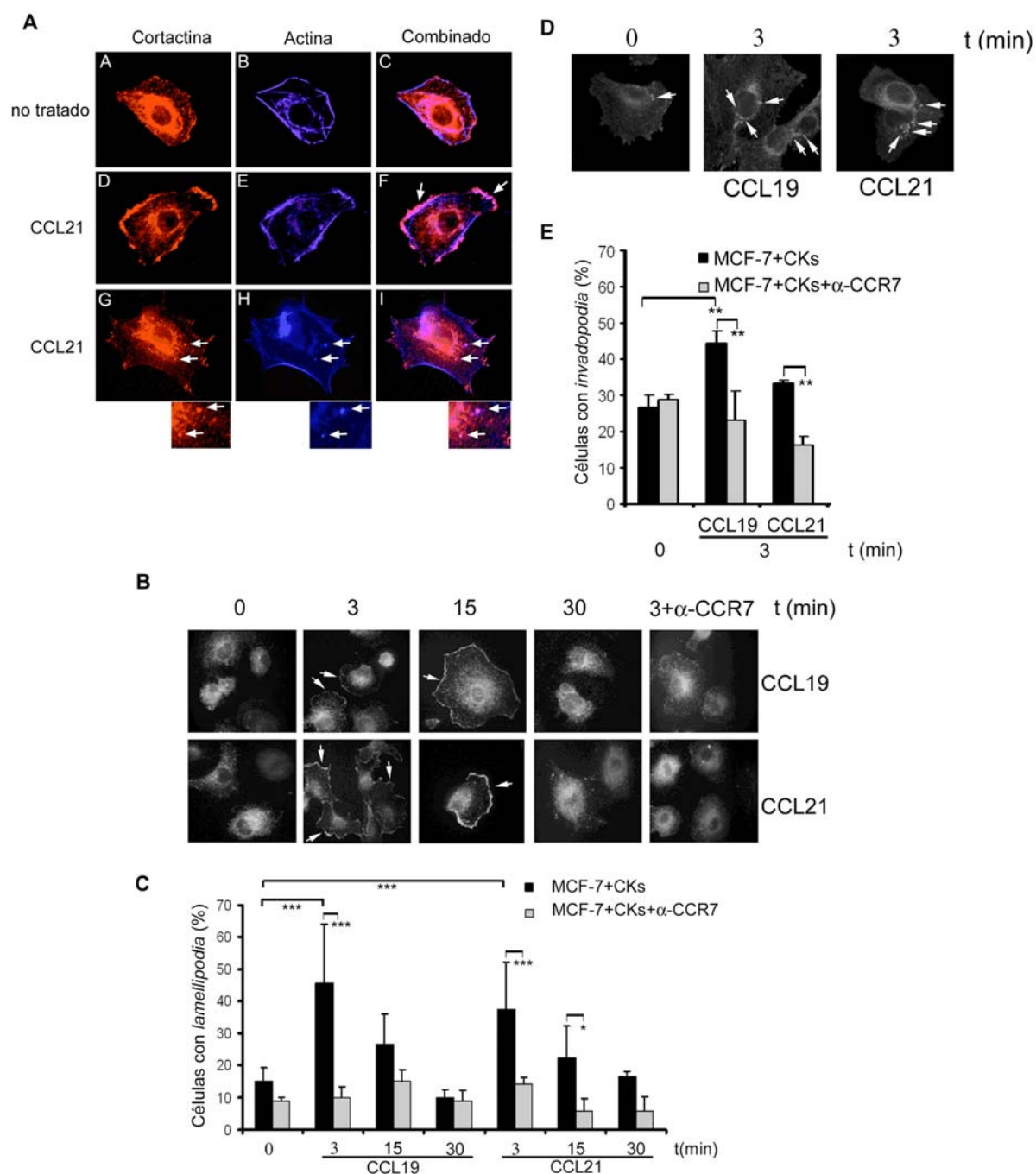


Figura 27. El Ac contra CCR7 inhibe la formación de estructuras corticales ricas en actina implicadas en migración e invasión celular. A) El tratamiento con CCL21 induce la formación de estructuras corticales ricas en cortactina. Células no estimuladas (A-C) o estimuladas con 1 μ g/ml CCL21 durante 3 minutos (D-F: *lamellipodia* y G-I: *invadopodia*). En rojo, tinción con el AcMo contra cortactina 4F11 (A, D y G). En azul, tinción con faloidina (B, E y H). C, F e I muestran la imagen combinada de ambas tinciones. Las imágenes muestran amplificación de 600x. B) CCR7 induce la formación de *lamellipodia*. Las flechas señalan la localización de cortactina con F-actina en *lamellipodia*. Por simplificar, sólo se muestran las tinciones con cortactina. C) Cuantificación del porcentaje de células con cortactina localizada en *lamellipodia* tras tratamiento con CCL19/CCL21 (n=5). D) CCL19 y CCL21 inducen formación de *invadopodia*. Las flechas indican las estructuras donde localizan cortactina y F-actina (para simplificar sólo se muestran las tinciones con cortactina). E) La gráfica representa el porcentaje de células con *invadopodia* antes y después de la activación de CCR7 (n=3). CKs, quimiocinas.

El Ac contra CCR7 neutraliza la migración e invasión de células de CM aunque su efecto citotóxico *in vitro* es limitado

El hecho de que el Ac contra CCR7 neutralizara la formación de *lamellipodia* e *invadopodia* indicaba un potencial MDA dependiente de región Fab consistente en neutralizar procesos migratorios e invasivos. Para confirmarlo, llevamos a cabo experimentos de migración en cámaras de Transwell (**Figura 28-A**) y de invasión en cámaras de Transwell recubiertas con Matrigel (**Figura 28-B**).

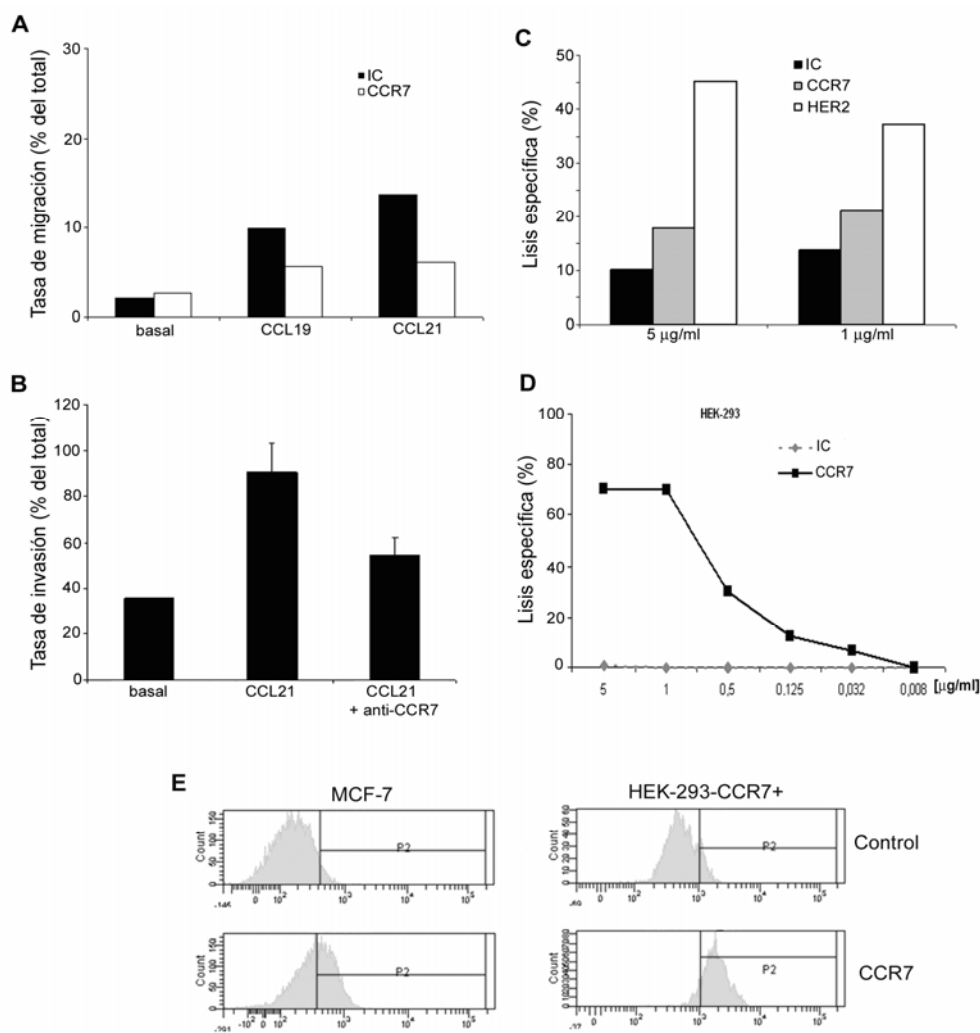


Figura 28. MDA dependientes e independientes de Fc del Ac contra CCR7 en células de CM. A) Bloqueo de la migración de células MCF-7 hacia los ligandos de CCR7. B) Bloqueo de la invasión en Matrigel guiada por CCL21 de células MDA-MB-231. El porcentaje de invasión se calculó como el cociente entre el % del total en membranas con Matrigel y el % del total en membranas sin Matrigel (n=2). C) Actividad CDC sobre células MCF-7. Se muestra el porcentaje de lisis específica de los Ac a estudio y de dos controles, un Ac irrelevante (IC) y trastuzumab (anti-HER-2). D) Actividad CDC sobre células HEK-293-CCR7⁺ que confirman que la lisis específica en células epiteliales depende de los niveles de CCR7 en superficie. E) Histogramas de frecuencia que muestran los niveles de expresión de CCR7 en células MCF-7 y células HEK-293-CCR7⁺.

En ausencia de ligando, las células MCF-7 presentaban un índice de migración bajo que aumentaba en presencia de CCL19 y CCL21. El uso del AcMo contra CCR7 redujo la tasa de migración aproximadamente a la mitad. En los experimentos de invasión realizados en cámaras de

Transwell recubiertas con Matrigel, las células MCF-7 no presentaban un fenotipo muy invasivo (datos no mostrados). Por ello, repetimos los experimentos de invasión con otra línea celular de adenocarcinoma mamario (MDA-MB-231), que también expresa CCR7, y se caracteriza por un fenotipo más invasivo. Aunque en este caso la migración basal era elevada, en torno al 40%, el uso de las CK promovía un incremento de invasión a valores del 100%. El uso del Ac contra CCR7 mermaba la tasa de invasión a valores próximos a los observados en condiciones basales (**Figura 28-B**).

En lo referente a los MDA dependientes de la región Fc, el AcMo no activaba al complemento de forma tan potente como en las enfermedades hematológicas. En la **Figura 28-C** se observa cómo la lisis específica en células MCF-7 con el Ac contra CCR7 rondaba el 20% mientras que el uso del Ac trastuzumab, dirigido contra la diana HER-2, mostraba valores en torno al 40%. Teniendo en cuenta la relación directa observada entre CDC y niveles de expresión del receptor, una de las explicaciones que nos planteamos era que los niveles en superficie de CCR7 en células MCF-7 no fueran lo suficientemente intensos como para activar CDC *in vitro*. Esta hipótesis quedó confirmada con el uso de células epiteliales HEK-293 transfectadas de manera estable con un plásmido de expresión conteniendo CCR7 (**Figura 28-D-E**). Para esta línea, los porcentajes de lisis específica eran elevados a dosis saturantes y en torno al 20% en dosis de 0.125 µg/ml. Aunque el potencial terapéutico de los Ac contra CCR7 en CM deberá ser confirmado en modelos *in vivo*, los datos aquí mostrados sugieren que el MDA dual de esta clase de Ac se da también en tumor sólido, y es probable que ayude a erradicar tumores primarios y prevenir y/o erradicar sus metástasis.

Discusión

En esta tesis se han presentado datos que apoyan que el receptor CCR7 es una nueva diana terapéutica en ciertas enfermedades tumorales, entre ellas, la LLC, la LPLT y el CM. A su vez, se ha profundizado en la validez de la IT con un AcMo contra dicho receptor en estos procesos neoplásicos, se han descrito los MDA mediados por esta clase de molécula y, en los casos concretos de la LLC o de la LPLT, se han identificado pacientes cuyas características biológicas les hacen ser candidatos a dicha terapia.

1. Señalización inducida por CCR7 en células tumorales: migración y supervivencia

Al comienzo de este trabajo se había descrito el papel fisiopatológico de CCR7 en determinadas enfermedades tumorales de origen hematológico o epitelial, como la LLC o el CM, respectivamente. Sin embargo, de la tercera enfermedad tratada en este trabajo, la LPLT, no había evidencias experimentales publicadas que demostrasen la presencia del receptor o un papel funcional del mismo en la patogénesis de la enfermedad. Nuestros datos revelan que CCR7 está presente en LPLT y que, además de una diana terapéutica para esta enfermedad, es una molécula implicada en diversas funciones celulares como la migración, la invasión y la supervivencia. Esto no es de extrañar si tenemos en cuenta que CCR7 se expresa en timocitos y que los ligandos del receptor guían a estas células en su desarrollo cortico-medular hacia células T maduras circulantes²⁰⁴⁻²⁰⁶. Además, se ha descrito que CCR7 participa en el desarrollo de células T $\alpha\beta$ adaptativas e innatas²⁰⁷ y, precisamente, el TCR con cadenas $\alpha\beta$ es el único observado en células de LPLT¹⁴¹, por lo que no podemos descartar que la presencia del receptor esté directamente relacionada con el fenotipo de la enfermedad.

También, al comienzo de este trabajo, el conocimiento acerca de las señales moleculares dependientes de la activación de CCR7 en células leucémicas era limitado. Sabíamos que en células T y B de individuos sanos las enzimas PI3K y las GTPasas regulaban la migración en respuesta a las CK homeostáticas CCL19 y CCL21, siendo la contribución relativa diferente en función de la CK y del tipo celular^{36,208,209}. Por ejemplo, en células T la migración celular hacia los ligandos de CCR7 depende fundamentalmente de la isoforma PI3K γ , mientras que en células B es la enzima PI3K δ de clase IA la necesaria para la quimiotaxis y la entrada en las PP y GL mesentéricos⁴⁰. En esta tesis se ha descrito en células de LLC la relevancia de las PI3K de clase IA en los procesos migratorios mediados por CCR7 hacia CCL19 y CCL21. En estas células, la respuesta migratoria hacia CCL19 y CCL21 era similar, lo que difería de la respuesta observada en células B normales, donde la tasa migratoria hacia CCL21 era ligeramente superior. Además, en células B sanas los inhibidores de PI3K afectaban en menor medida a la respuesta migratoria hacia CCL21 que aquella hacia CCL19. Curiosamente, esta preferencia por CCL21 de las células B sanas se ha visto también en DC²¹⁰ por lo que la capacidad que tienen las células de LLC de responder en igual medida a los dos ligandos de

CCR7 puede tener un papel en la etiopatogenia de la enfermedad. De hecho, un estudio en LLC demuestra cómo los pacientes con menor expresión de CXCR, un “*deceptor*” que elimina CCL19 del medio, migran más a CCL19 y presentan más adenopatía ²¹¹.

De forma similar, el uso de los inhibidores de ROCK también producía un patrón inhibitorio diferencial entre células leucémicas y células sanas, aunque en este caso la tasa de inhibición era mayor que con los inhibidores de PI3K. Puede ser que parte de esta diferencia se deba al hecho de que la subunidad reguladora p85 α puede reclutar y/o activar otras moléculas implicadas, como las pequeñas GTPasas ²¹², por lo que inhibiendo ROCK se inhiba, además, parte de la señalización mediada por el eje CCR7-PI3K. Prueba de ello son los resultados obtenidos en ensayos de migración con la forma DN de la subunidad reguladora p85 α y que mostraban mayor inhibición que con los inhibidores químicos utilizados (wortmanina y LY-294002). Independientemente de estas diferencias en la tasa inhibitoria, está claro que nuestros datos apoyan un papel relevante de la vía de señalización RhoA/ROCK en la migración de células de LLC mediada por CCR7 ya que la inhibición de ROCK disminuía de manera importante la migración hacia los ligandos de CCR7. Resultados similares han sido observado en otros CKR ²¹³ y, en el caso concreto de CCR7, en células T ⁴⁸ y en DC ⁴²⁻⁴⁴. En LLC, como demuestran los experimentos de inmunoblot con células de dicha patología, este efecto puede estar mediado, al menos parcialmente, por la inhibición de la fosforilación de MLC, proceso que regula la contractibilidad celular y la migración ^{48,49}.

Aunque las MAPK juegan un papel fundamental en la quimiotaxis mediada tanto por quimiocinas CXCR como CC ¹² y, en particular, en la migración *in vitro* de las DC mediada por CCR7 ⁴¹⁻⁴⁴, este papel no es relevante en LLC o al menos no lo es de forma directa para la quimiotaxis en condiciones no restrictivas como son los TW desnudos. Sin embargo, la actividad de ERK1/2 parece ser necesaria para la expresión y secreción de la metaloproteasa MMP-9, implicada en migración a través de endotelio e invasión de Matrigel de las células de LLC en respuesta a las quimiocinas CCL21 ¹²⁹ y CXCL12 ²¹⁴. Según nuestros datos, dicho proceso secretor se reproduce en células de LPLT y, aunque en el caso concreto de esta patología no hemos estudiado los mecanismos moleculares implicados, ERK1/2 es un claro candidato para mediar en este proceso. Por otro lado, pudiera ser que las MAPK participaran aumentando la expresión o función de moléculas de adhesión, necesarias para la migración a través de endotelio o matrices biológicas, o que estuvieran implicadas en la formación de estructuras corticales de actina. Estas últimas son necesarias durante los primeros pasos de los procesos invasivos mediados por CCR7 que, como confirman los datos presentados en esta tesis, ocurren en células de CM y podrían darse también en otro tipo de tumores. La unión de los ligandos a CCR7 induce respuestas quimiotácticas e invasivas en las células de CM que pueden ser críticas para el desarrollo de metástasis a GL y órgano distante. Según nuestros datos, el mecanismo molecular subyacente a dichas respuestas implica la señalización del eje ERK1/2-cortactina que promueve estructuras celulares como *lamellipodia* e *invadopodia*, siendo ambas esenciales para el inicio del complejo proceso de metástasis. Aunque cortactina no tiene capacidad intrínseca de inducir

la formación de *lamellipodia*, sí prolonga su duración tras ser activada por receptores de factores de crecimiento ^{215,216}. Por tanto, pudiera ser que el papel de la cortactina en la metástasis inducida por CCR7 fuera dual. Por un lado, regulando la persistencia de los *lamellipodia* generados tras la activación mediada por CCR7 y, por otro lado, regulando el desarrollo y función de los *invadopodia*, como se ha demostrado para otros receptores ^{201,202,217}.

Otras estructuras ricas en actina que favorecen la quimiotaxis e invasión mediada por el receptor CCR7 son los *pseudopodia* ⁵⁵ y, a pesar de que no hemos estudiado la participación de cortactina en esta vía de señalización, es posible que desempeñe un papel importante. Lo mismo puede ocurrir en otros procesos clave de la célula tumoral, como la división celular, pues cortactina es un eje principal de la regulación de las redes de actina y una molécula clave en señalización celular ²⁰³. No podemos olvidar que en las últimas décadas la cortactina ha ganado relevancia en el escenario de la biología tumoral y su presencia y/o sobreexpresión se ha correlacionado con la presencia de metástasis y aumento de mortalidad en CM ^{218,219} y otros tumores sólidos ²⁰³.

Cada vez está más claro que el MAT de los OLS promueve la supervivencia de las células leucémicas o linfomatosas pudiendo además proteger a dichas células de la terapia citotóxica y favoreciendo así una futura recaída ⁸⁹. Para el éxito de la IT tumoral es tan importante inhibir la señalización dentro del MAT como impedir la llegada de las células tumorales al mismo. Los experimentos *in vitro* (de migración y de supervivencia) y la prueba de concepto presentados en esta tesis confirman dicho planteamiento y resaltan el papel de CCR7 en todo el proceso. En un primer paso, CCR7 facilita la entrada de las células tumorales en los OLS. En un segundo paso, la activación de CCR7 interviene en un aumento de viabilidad del clon de LLC, LCM o LPLT en OLS. Según nuestros datos, en el caso de la LLC este efecto estaría mediado por las vías de ERK1/2, PI3K y JNK, mientras que en otras neoplasias B, como el LCM o el linfoma folicular, los datos publicados confirman que la enzima PI3K presenta un papel predominante ^{220,221}. En el caso de la LPLT, no hemos estudiado las moléculas implicadas en supervivencia, sin embargo, el eje PI3K/AKT se postula como un fuerte candidato a mediar este efecto ^{142,222}. Si bien es cierto que en nuestras manos dicho aumento de supervivencia en LLC y LPLT era muy discreto, éste podría ser suficientemente relevante si tenemos en cuenta que la tasa de recambio observada en los centros de proliferación en pacientes de LLC presenta valores no muy altos (< 1%) ^{98,223}. Además, dichos valores concuerdan con aquellos observados en LLC por otros autores al estudiar la supervivencia inducida por CCR7 y CXCR4 ^{132,134}.

Por último, cabe destacar que es probable que la participación de CCR7 no sólo se limite a la entrada y supervivencia de la célula tumoral en el MAT sino que, además, incluya la formación de dicho MAT, proceso orquestado por las células tumorales al atraer células T, células reguladoras o células estromales ⁸⁹. En este caso, el papel de CCR7 podría ser el de atraer a las células soporte del MAT hacia los GL, y una vez ahí, guiarlos dentro del mismo, pues CCL19 y CCL21 se expresan constitutivamente dentro de los OLS ^{25,26} y regulan la entrada y organización funcional de los linfocitos y las DC desde el punto de entrada, el seno subcapsular, a las áreas T ^{224,225}. En línea con

esta hipótesis, recientemente el grupo de Reinhold Förster ha demostrado que la ausencia de DC en GL afecta de forma directa a la recirculación linfocitaria reduciendo la entrada de células T ³³. Además, han mostrado cómo la ausencia de DC en el GL reduce el número de HEV y afecta a la producción de CCL21 por parte de los fibroblastos reticulares de la zona T (TRC) lo que reduce aún más el *homing* de células T y disminuye el tiempo que las células T permanecen dentro del GL. Todos ellos, HEV, TRC, DC y células T forman parte del MAT y, en base a los datos del laboratorio de Förster, es muy probable que las terapias dirigidas contra CCR7 reduzcan el número de células accesorias presentes en el mismo y sus funciones protumorales.

2. Inmunoterapia contra CCR7

Dada su implicación en los procesos tumorales descritos, el receptor CCR7 se presenta como una novedosa e interesante diana terapéutica. Sin embargo las aproximaciones terapéuticas dirigidas contra los CKR no son fáciles de desarrollar. La modulación farmacológica de los CKR, por ejemplo mediante análogos de CK bloqueantes o pequeñas moléculas (del inglés *small molecules*) antagonistas, ha dado poco fruto, lo que desvela la dificultad de desarrollar este tipo de compuestos ^{2,226}. Aunque en 2009 diez de los 19 CKR habían sido seleccionados como dianas terapéuticas, a comienzos de 2014 tan sólo contábamos con dos representantes del desarrollo de *small molecules* antagonistas en la clínica: AMD3100 (contra CXCR4) para movilización de precursores hematopoyéticos y Maraviroc (contra CCR5) para tratamiento de la infección por HIV-1 ². Lo mismo ocurre con el desarrollo de los AcMo contra receptores de CK ²²⁶. A pesar de la gran cantidad de Ac que se han aprobado para el tratamiento del cáncer o enfermedades inflamatorias, tan solo uno, mogamulizumab (Ac contra CCR4), está aprobado en clínica y otros dos se hayan en ensayos clínicos ²²⁶, ulocuplumab (Ac contra CXCR4) y MLN1202 (Ac contra CCR2) (www.ClinicalTrials.gov). La dificultad en desarrollar esta clase de AcMo puede deberse a la naturaleza de los GPCR humanos, caracterizada por su homología con CKR múridos, su limitada disponibilidad como proteínas purificadas y su baja inmunogenicidad pues son proteínas embebidas en membrana ²²⁶⁻²²⁸. A pesar de estas dificultades, en esta tesis se propone al receptor CCR7 como diana terapéutica para el tratamiento de neoplasias linfoides y de órgano sólido. Por un lado, CCR7 puede ser diana de agentes biológicos y no biológicos con actividad citotóxica sobre la célula tumoral. Por otro lado, inhibir la función y la señalización inducida por este receptor, puede ser una útil herramienta terapéutica para inhibir el crecimiento tumoral y prevenir la formación de metástasis. A continuación se describen algunas de las aproximaciones potenciales que ofrece esta diana.

2.1. Inhibidores de las vías de señalización de CCR7

Una de las opciones para inhibir la señalización mediada por CCR7, y por tanto sus funciones protumorales, es el uso de inhibidores específicos de las distintas enzimas descritas en esta tesis e involucradas en su señalización (**Figura 29**). En los últimos años se ha desarrollado un número considerable de compuestos inhibidores específicos de PI3K ²²⁹, RhoA/ROCK ^{230,231} y ERK1/2 ^{232,233}

que han demostrado su eficacia en ensayos preclínicos o clínicos y que nos sirven para confirmar la hipótesis propuesta en este trabajo de que la inhibición de estas vías tiene aplicabilidad en el tratamiento de leucemias, linfomas y tumores sólidos. De entre aquellos que han tenido mejores resultados clínicos podríamos nombrar a los inhibidores de PI3K δ , ejemplificados en la molécula Idelalisib. Estas moléculas tienen una eficacia terapéutica elevada y, curiosamente, es gracias a la inhibición de mecanismos muy similares a los descritos en esta tesis para el eje CCR7-PI3K. El bloqueo de PI3K δ con inhibidores selectivos previene la diseminación de células de LLC, linfoma folicular y LCM a tejidos y OLS^{234,235}. Dichos inhibidores disminuyen las interacciones de las células tumorales con el MAT y aumentan así la tasa de células apoptóticas en SP^{234,235}. Por tanto, aunque se sabe que su efecto deriva del bloqueo de señales proliferativas y de supervivencia en el MAT, no podemos descartar que dichos inhibidores también afecten a la entrada a los OLS promovida por el eje CCR7-PI3K.

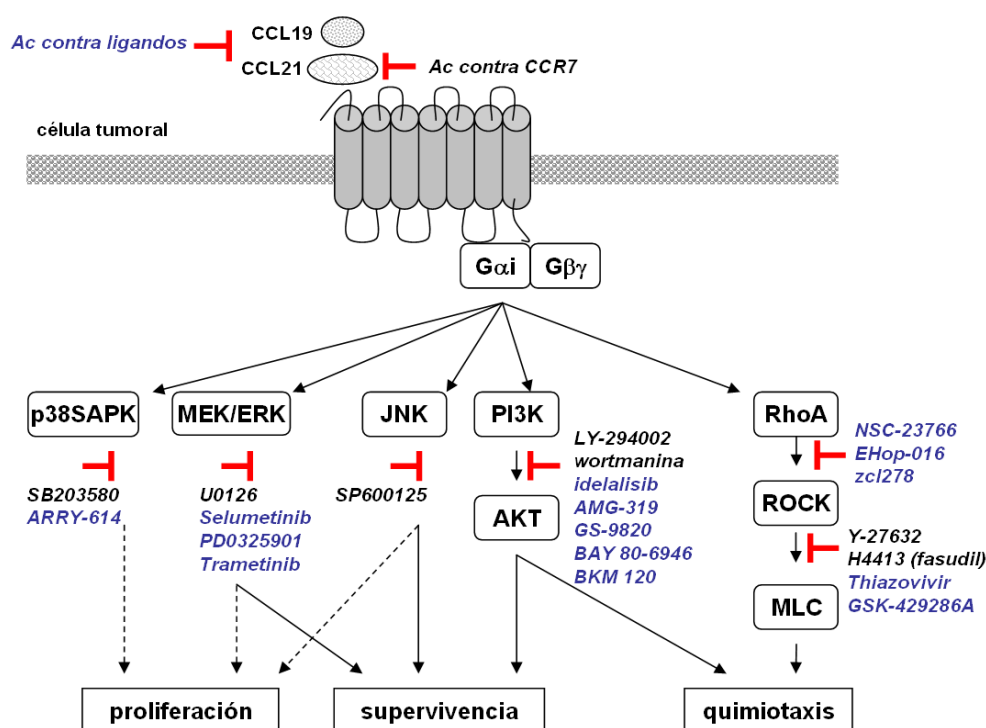


Figura 29. Agentes terapéuticos en uso o en desarrollo que pueden inhibir la señalización mediada por CCR7. En negro, se indican aquellas moléculas usadas en este trabajo. En azul, aquellas que se encuentran en fases de ensayos clínicos o que ya se están usando en la práctica clínica.

Una de las características más buscadas en los inhibidores es su selectividad, es decir, la especificidad por enzimas concretas, e incluso por isoformas presentes en el clon tumoral y no en células sanas²³⁶. Según hemos demostrado, en células B normales la enzima p38-SAPK contribuye a la migración mediada por CCR7, mientras que en LLC esta vía no participa. Por lo tanto, terapias dirigidas a bloquear PI3K no tendrían porqué afectar a la población B sana que podría seguir entrando en OLS gracias al eje CCR7-p38-SAPK. Además, la vía de PI3K media una respuesta migratoria a los

ligandos de CCR7 diferente entre las células de LLC y los linfocitos B normales. Como ya hemos indicado, en LLC, y en contra de lo que ocurre en células B sanas, la respuesta a ambos ligandos es similar, y ambas respuestas se ven afectadas de igual manera por el uso de inhibidores de PI3K. Estas diferencias pueden explicar datos recientes que muestran cómo la sensibilidad y eficacia observadas con inhibidores de PI3K son mayores en células de LLC que en células B sanas²³⁶ y, en el caso de células B sanas, están en consonancia con datos referentes a la diferente sensibilidad de las DC a ambas CK. En gradientes altos de CK, las DC migran mejor hacia CCL21 que hacia CCL19 e incluso migran de forma preferente hacia CCL21 en gradientes simultáneos, iguales y opuestos de ambas CK²¹⁰.

Para concluir, me gustaría resaltar que al inhibir enzimas que son puntos de confluencia de la señalización de diferentes receptores, como es el caso de la enzima PI3Kδ o de la enzima tirosina quinasa de Bruton (Btk), y, por tanto, son relevantes para varios CKR y receptores de otras familias, como el BCR, puede que el efecto total derivado del uso de estos inhibidores sea consecuencia de la suma de las inhibiciones de diferentes funciones celulares mediadas por los distintos receptores. Por tanto, la probabilidad de que surjan resistencias también es mayor. Ejemplo de ello, en LLC, puede ser la molécula ibrutinib (un inhibidor específico de la enzima Btk) que no sólo afecta a la señalización mediada por el BCR en dichas células sino que además afecta a la adhesión y migración celular inducidas por el receptor CXCR4²³⁷.

2.2. *AcMo contra CCR7*

2.2.1. Mecanismo de acción dual y único

Otra posible opción para inhibir la señalización mediada por CCR7 es el uso de Ac contra el receptor o contra los ligandos (**Figura 29**). En el campo de la IT con AcMo, usar los ligandos como diana no ha resultado ser un vía muy efectiva²³⁸. Sin embargo, CCR7 se postula como una diana muy atractiva ya que no sólo cumple con los requisitos de altos niveles de expresión en la superficie de la célula tumoral, sino que también juega un papel crucial en la biología y en el patrón de diseminación de las enfermedades analizadas en este trabajo. Además, la expresión de CCR7 está restringida a ciertas subpoblaciones celulares en los diferentes órganos y tejidos linfoides, y está presente en todos los estadios de la enfermedad (como hemos visto en LLC y en LPLT). Por estos motivos decidimos evaluar el uso de un AcMo contra CCR7 como una novedosa herramienta en IT del cáncer. Uno de los aspectos más atractivos que hemos observado de la IT con un Ac contra CCR7 es el hecho de que esta molécula presenta un singular MDA no presente en otros AcMo en mercado o en desarrollo: induce muerte celular (por bloqueo de la diana o a través de mecanismos inmunitarios efectores) y además bloquea la migración de las células tumorales a OLS u otros sitios donde se encuentren las CK ligando del receptor.

Uno de los principales obstáculos que se debe superar para garantizar la eficacia del arsenal terapéutico antitumoral, en uso y en desarrollo, es la presencia de la enfermedad en GL y otros OLS.

Como ya se ha señalado, las células aquí migradas suelen encontrar nichos que fomentan la proliferación y supervivencia de la célula tumoral, y/o que favorecen la tolerancia inmunológica hacia la célula neoplásica y/o que simplemente dan cobijo físico y protegen frente a los agentes terapéuticos⁸⁹. Por ello, dirigir nuestros esfuerzos contra moléculas implicadas en la entrada de las células tumorales en estos santuarios es de vital importancia. Sin embargo, cuando hablamos de terapia con AcMo, una potencial limitación común en el repertorio actualmente disponible es, precisamente, la falta de eficacia reduciendo linfadenopatías. Esta situación está bien documentada en numerosos tumores sólidos²³⁹ y en neoplasias B tratadas con rituximab²⁴⁰, ofatumumab²⁴¹ o alemtuzumab²⁴². La distribución de la enfermedad también es un factor determinante en LPLT, donde la tasa de respuestas a alemtuzumab es baja si los pacientes presentan infiltración de SNC o adenopatías prominentes¹⁴³. Ante esta situación, la terapia con el AcMo contra CCR7 nos invita a ser optimistas y a pensar que uno de sus potenciales beneficios clínicos será, precisamente, la reducción de adenopatías por bloqueo de señales quimiotácticas procedentes de GL y otros OLS e implicadas en *homing* linfocitario y metástasis de células epiteliales.

En primer lugar, nuestros datos *in vitro* han confirmado la utilidad de estos Ac neutralizando la secreción de MMP-9 mediada por CCR7 y la posterior invasión en matrices biológicas de células de LPLT, dos procesos también mediados por CCR7 en otras malignidades hematológicas^{129,243} y tumores sólidos²⁴⁴. Además, los Ac bloquean la migración a través de endotelio vascular de las células de LPLT, un hito importante para bloquear la diseminación de tumores sólidos y hematológicos pues CCL21 se puede encontrar en las HEV de los vasos linfáticos de varios órganos^{23,24}. En segundo lugar, la prueba de concepto llevada a cabo en el modelo mûrido de LCM confirma que la terapia con el Ac contra CCR7 bloquea la diseminación de células tumorales a bazo y MO. En esta línea, nuestro laboratorio ha desarrollado nuevos modelos ortotópicos de LCM emulando enfermedad de reciente comienzo o enfermedad establecida que no sólo confirman el bloqueo de la migración a órganos linfoides sino que amplían dicho bloqueo a otros órganos como pulmones o SNC, eliminando, de esta manera, la enfermedad tumoral en dichas localizaciones²⁴⁵.

El Ac usado en nuestros estudios^{246,247} destaca por ser un potente activador de CDC, y como hemos demostrado, este mecanismo es más efectivo cuanto mayor es la densidad de la diana en superficie^{247,248}. Ello explica las tasas de lisis específicas tan altas observadas en LLC y LPLT o en células HEK-293-CCR7⁺. En cambio, esta molécula no es un activador de la función efectora ADCC en células humanas o de ratón, probablemente debido a su origen mûrido y a su isotipo IgG2a. Sin embargo, las técnicas actuales permiten optimizar las características deseadas de cualquier Ac terapéutico mediante la selección de la cadena pesada y/o el uso de glico-ingeniería y/o alterando la secuencia de aminoácidos mediante mutagénesis puntual. Todas estas aproximaciones permiten, en diferentes combinaciones, modular las funciones efectoras¹⁶⁷. Por ejemplo, los AcMo con oligosacáridos defucosilados en la Asn 297 en cada dominio CH2 de la Fc-IgG1 inducen una mayor actividad ADCC *in vitro* y una mayor actividad anti-tumoral *in vivo* a dosis significativamente

menores que los Ac terapéuticos convencionales^{249,250}. Gracias al uso de dichas aproximaciones están empezando a surgir los AcMo de tercera generación, como obinutuzumab (GA101), un AcMo glico-ingenierizado no fucosilado dirigido contra CD20 con funciones efectoras ADCC y CDC mejoradas²⁵¹. Lo mismo ocurre con el Ac contra CCR7 que estamos desarrollando. Datos preliminares, y todavía confidenciales, resultantes de la humanización de la molécula combinada con mutagénesis dirigida en su porción Fc, confirman el potencial de la ingeniería genética para la mejora del Ac contra CCR7 en la clínica. Téngase en cuenta que recurrir a técnicas moleculares no es el único mecanismo descrito para potenciar las actividades efectoras de un AcMo pues existen sustancias de amplio uso en la clínica que, administradas en terapias combinadas, pueden afectar a las funciones CDC y/o ADCC. Por ejemplo, la fludarabina no sólo disminuye la expresión de CCR7, sino que también disminuye la expresión de las proteínas inhibitoras del complemento CD55 y CD59 de la superficie celular facilitando la lisis de la célula diana²⁵². Ciertos agentes como la bromohidrina y lenalidomida potencian, así mismo, la ADCC^{253,254}. Otro aspecto importante a tener en cuenta es la presencia de polimorfismos poblacionales bien en las células efectoras que median la ADCC o bien en proteínas claves en la cascada del complemento^{184,187} y que pueden variar según cómo se desarrolle la molécula. Por ello, para el éxito de la terapia con el Ac contra CCR7, es tan importante modelar la molécula idónea como monitorizar las respuestas clínicas en monoterapia o en combinación.

Junto con los mecanismos efectores mediados por la inmunidad celular o humoral, el AcMo contra CCR7 también ha mostrado cierta actividad induciendo muerte celular al bloquear señales de supervivencia mediadas por los ligandos de CCR7. Este MDA se ha visto de forma directa en LPLT aunque no se ha estudiado qué moléculas estarían implicadas. Como se ha indicado anteriormente, dos candidatos serían PI3K y ERK, ya que el Ac contra CCR7 bloquea esas vías de señalización en LPLT y ambas moléculas se consideran muy relevantes en la patogénesis de dicha enfermedad^{222,255}. Además, son dos rutas de supervivencia importantes dentro de la biología del receptor CCR7 en LLC^{134,246} y tumores sólidos⁶⁰. Por ello, es muy probable que el uso del Ac contra CCR7 neutralice las vías de supervivencia en el GL u otros OLS en LLC y LPLT, entre otros.

Desde un punto de vista teórico, podríamos inferir cierta analogía entre los MDA del Ac contra CCR7 y los MDA de los inhibidores de quinasas del BCR. Estos últimos inducen la movilización de las células leucémicas desde tejidos a SP^{118,256}. Una vez en SP, se cree que las células de LLC mueren por abandono, esto es, ausencia de señales de crecimiento y supervivencia proveniente del MAT y por abolición de la resistencia a drogas inducida por las células estromales⁸⁹. Según este razonamiento, la primera similitud la encontramos en el hecho de que el Ac bloquearía el regreso de las células leucémicas a los OLS, lo que aumentaría el número de células tumorales presentes en SP, e indirectamente, la tasa de células apoptóticas por falta de señales del MAT. Como segunda similitud, en caso de darse la entrada en OLS de células opsonizadas por el Ac, éste aboliría la señalización protumoral mediada por los ligandos, como hacen los inhibidores de quinasas del

MAT. Sin embargo, y a diferencia de los inhibidores, el Ac también actuaría como un agente inductor de muerte celular de forma directa dada sus capacidades efectoras citotóxicas mejorando, en teoría, la eficacia de los inhibidores del BCR. Por ello, el uso de un Ac contra CCR7 podría ser beneficioso no solo en el tratamiento de la enfermedad en SP, GL y MO, sino también en el escenario de la EMR.

2.2.2. Células inmunoregulatoras y microambiente tumoral

Un potencial MDA que ofrece este tipo de Ac es la eliminación de células Treg y/o bloqueo de la migración de este tipo celular. Se sabe que las células Treg, indispensables para el mantenimiento de la auto-tolerancia y la homeostasis ²⁵⁷, requieren de CCR7 para su actividad supresora *in vivo* ²⁵⁸. Las células Treg naturales, que expresan CD25 (cadena α de IL-2R) y el factor de transcripción FOXP3 ²⁵⁹, migran gracias al receptor CCR7 a GL donde proliferan e inhiben la generación de células T específicas de Ag ²⁵⁸ y, dado que la mayoría de los Ag asociados a tumor son propios ²⁶⁰, dichas células Treg frenan el desarrollo de una inmunidad antitumoral efectiva ²⁶¹. De hecho, las células Treg son abundantes en tejidos tumorales y su eliminación aumenta las respuestas inmunes antitumorales espontáneas e inducidas por vacunas en modelos animales ²⁶². En el caso de la LLC, esta población está significativamente aumentada en SP y OLS y, a través de modificaciones en el MAT y ciertas moléculas coestimuladoras, facilitan el crecimiento del clon de células de LLC ²⁶³. Por tanto, uno puede esperar que el bloqueo de la migración mediada por CCR7 de las células Treg a los GL y/o la depleción de dicha subpoblación reguladora sean mecanismos eficaces para terminar con la tolerancia al tumor mediada por esta población celular. Lo más atractivo de este MDA del Ac contra CCR7 es la capacidad para potenciar la inmunidad antitumoral sin afectar a las células T efectoras (que no expresan CCR7) y sin inducir autoinmunidad secundaria al tratamiento. A favor de este planteamiento contamos con datos recientes obtenidos con el uso de mogamulizumab, otro Ac contra CKR, que ha demostrado ser efectivo eliminando selectivamente células Treg sin causar autoinmunidad secundaria ²⁶¹. Esta selectividad es una gran ventaja y hace que el MDA difiera notablemente de aquel de los Ac dirigidos contra CD25 y usados con el fin de eliminar las Treg. Dichos Ac no sólo eliminan Treg, también reducen el número de células T efectoras activadas anulando así el efecto conseguido con la eliminación de células Treg ²⁶². Otra contrapartida del uso de AcMo contra CD25 es la inducción de autoinmunidad como efecto secundario ²⁶⁴. Como contrapartida del uso del AcMo contra CCR7 podríamos indicar que, potencialmente, la eliminación de las células Treg conlleve un aumento de expresión del antígeno CTLA-4 en las células T efectoras ²⁶⁵, por lo que en este caso la terapia combinada con el AcMo tremelimumab tendría un efecto sinérgico antitumoral como se ha demostrado recientemente en modelos *in vivo* ²⁶⁵.

Dada la relevancia del MAT en la enfermedad tumoral, sería interesante analizar si otros tipos celulares protumorales, por ejemplo MDSC o, en el caso de la LLC, las células T adyacentes a células de LLC CD38⁺ ^{89,94,266,267} expresan CCR7. Sería interesante, además, estudiar si dichas células accesorias son atraídas a las proximidades de las células tumorales gracias a las quimiocinas CCL19 y

CCL21 y si el receptor CCR7, en concierto con moléculas de adhesión como CD62L o VLA4, está implicado en la coevolución del clon patológico y su MAT de apoyo. De ser así, el tratamiento con Ac contra CCR7 afectaría a la composición del MAT tanto a nivel de células tumorales como de células accesorias.

2.2.3. Toxicidad y efectos secundarios

Se podría predecir que la terapia con AcMo contra CCR7 será bien tolerada en pacientes. Datos *in vitro* e *in vivo* nos hacen pensar que, en caso de aparecer, la inmunodeficiencia secundaria al tratamiento con este tipo de Ac no sea muy importante y, en todo caso, menos severa que la causada por otros tratamientos de referencia o en ensayos clínicos. En las pruebas *in vitro* realizadas, esta terapia muestra menores toxicidades que alemtuzumab en células no tumorales procedentes tanto de pacientes como de sujetos sanos. Este fenómeno es en parte debido a la expresión restringida de CCR7 a ciertas poblaciones hematológicas no tumorales y a los bajos niveles de expresión de la diana en éstas, lo que afecta a la magnitud de la CDC *in vitro* mediada por este tipo de AcMo^{247,248}. Por el contrario, y como ejemplo, decir que los altos niveles de expresión de CD52 en la mayoría de las poblaciones leucocitarias restringe el uso de alemtuzumab dado el alto riesgo de desarrollar infecciones oportunistas y/o complicaciones infecciosas²⁶⁸.

Dentro del linaje B, la lisis específica *in vitro* de células B normales CCR7⁺ es limitada, incluso con concentraciones saturantes de Ac. Y aunque CCR7 se expresa en la mayoría de los linfocitos B circulantes, incluyendo células *naïve* y de memoria^{269,270}, el bloqueo del homing durante la diferenciación B dependiente o independiente de Ag no tiene por qué afectar a las respuestas B. Prueba de ello es la capacidad que tienen los ratones deficientes en CCR7 de generar respuestas humorales²⁷¹. Por otro lado, como los precursores de linaje B de MO y las células plasmáticas secretoras de Ac carecen de CCR7⁵⁴, es muy probable que esta terapia tampoco afecte a la linfopoyesis B ni a la función secretora de Ig.

Dentro del linaje T, CCR7 se expresa en células *naïve* y TMC, por lo que las células T efectoras o de memoria efectora no se verían afectadas. Las células Treg constituyen otra población que expresa CCR7 aunque las implicaciones de la terapia contra CCR7 en estas células se ha detallado más arriba. En lo referente a las DC, la expresión de CCR7 no es suficientemente intensa como para inducir CDC en dichas células²⁴⁸ aunque sí puede bloquear la migración de estas células presentadoras de Ag a GL. Sin embargo, los ratones deficientes para CCR7 pueden montar respuestas inmunitarias (aunque menos efectivas que sus homólogos con fenotipo *wild-type*²⁰) a través de vías alternativas que no impliquen CCR7 como es la difusión de ciertos Ag periféricos a los OLS²⁷², donde son reconocidos por las células T que acceden a través de otros CKR alternativos que compensan la ausencia de CCR7^{273,274}. También existe la posibilidad de que las DC de ratones deficientes para CCR7 puedan presentar Ag a células T *naïve* y células T efectoras fuera de los GL²⁰. En inmunología tumoral, algunos de estos sitios de presentación antigénica extraganglionar pueden

ser el propio MAT y las recientemente descritas estructuras linfoides terciarias (TLS). Estas TLS se forman *de novo* en tejido tumoral y se asocian con mayor supervivencia a largo plazo de los pacientes, en parte porque facilitan la interacción de las DC con células T CD4⁺ de memoria y con células T CD8⁺ específicas de tumor favoreciendo respuestas inmunitarias antitumorales ²⁷⁵. Otro punto a tener en cuenta es que la entrada de estos tipos celulares dentro de los TLS a través de HEV no depende únicamente de los ligandos de CCR7 sino que pueden usar otras CK como CXCL13 ²⁷⁶, que se une a CXCR5, o los ligandos de CXCR3 (entre ellos CXCL10) ²⁷⁵, por lo que el bloqueo de CCR7 no supondría un impedimento en la activación local de respuestas inmunitarias específicas de tumor.

Para concluir, cabe indicar que, en base a los modelos con ratones deficientes, el principal efecto adverso que podría asociarse a la terapia con Ac contra CCR7 sería la presencia de enfermedades inflamatorias, muy comunes en este tipo de ratones ^{20,258}. Sin embargo, nuestros datos *in vivo* corroboran la baja toxicidad esperada. Entre ellos, contamos con datos obtenidos por la empresa IMMED al administrar el Ac contra CCR7 a ratones transgénicos *knock-in* para el receptor humano (datos confidenciales, no mostrados), datos obtenidos de tratar con el Ac a ratones injertados con células humanas de LCM ²⁴⁵ o LAL-T, y otros datos propios, no publicados, obtenidos de tratar con el Ac animales de un modelo de enfermedad de injerto contra huésped. En todos estos modelos, el tratamiento con el Ac contra CCR7 no conlleva ningún efecto tóxico aparente ni da pie al desarrollo de enfermedades inflamatorias o autoinmunes secundarias. Curiosamente, los ligandos de CCR7 aumentan en lesiones inflamatorias ateroscleróticas ²⁷⁷, por lo que el bloqueo del receptor podría ser en sí mismo una vía terapéutica novedosa para algunas entidades inflamatorias.

2.2.4. Indicaciones en pacientes de alto riesgo

Los pacientes de LLC con enfermedad refractaria a regímenes que contienen fludarabina y/o con *del17p* siguen siendo uno de los principales problemas para los clínicos debido a sus escasas opciones terapéuticas. Las tasas de respuesta al tratamiento de referencia (FCR) para estos pacientes son universalmente pobres ^{117,124} y paulatinamente aumenta el número de dichos pacientes que no responden a los inhibidores del BCR ²⁷⁸. Por ello, estos pacientes son candidatos a nuevas terapias con mecanismos de acción independientes de P53, como los AcMo bien en monoterapia o en combinación ²⁷⁸. Como parte de la presente tesis se ha testado la efectividad de AcMo contra CCR7 en estos grupos de pacientes, y se ha podido confirmar *in vitro* que este tipo de IT se postula como una opción terapéutica factible que supera en actividad a alemtuzumab, el Ac con la eficacia terapéutica más alta en pacientes con *del17p* y/o LLC-RF ¹²⁴. Parte de la efectividad de los Ac analizados se debe a que la densidad de la diana CCR7 en la superficie de la célula de LLC de alto riesgo es notablemente superior que la de otras dianas como CD20 y CD52, independientemente del número de líneas de tratamiento recibidas ²⁴⁷, lo que condiciona la actividad clínica de los Ac en oncohematología ²⁷⁹. Estos resultados nos hacen pensar que el Ac contra CCR7 también será efectivo en pacientes con

mutaciones inactivas del gen *TP53*, cuya respuesta a terapias y supervivencia es igual de pobre que en el grupo *del17p*¹¹². Aunque no tenemos datos relativos a esta población, podemos esperar que los resultados sean similares dado que el MDA sería el mismo que en pacientes *del17p* e independiente de P53. Apoyando esta suposición, presentamos datos de la eficacia en dos grupos distintos de pacientes. Por un lado, en aquellos pacientes doble refractarios a fludarabina y alemtuzumab^{198,241}. Por otro lado, en pacientes portadores de la alteración citogenética *del11q* que afecta a otro componente importante de la vía de P53, la proteína ATM²⁸⁰. Estos pacientes también son problemáticos pues muestran bajas tasas de supervivencia, progreso más rápido de la enfermedad, quimioresistencia y mayor extensión de la linfadenopatía^{100,106,280}. Es interesante destacar que el modelo *in vivo* de LCM²⁴⁵ es un modelo basado en la línea Granta-519, línea deficiente en ATM y de elevada agresividad²⁸¹, por lo que podemos concluir que el Ac contra CCR7 es eficaz contra esta alteración genética específica tanto *in vitro* como *in vivo*.

Datos recientes confirman que la proteína NOTCH-1 es un factor pronóstico independiente en LLC. En un 10% de los casos de LLC al diagnóstico, se observa una mutación activadora de NOTCH-1 en el dominio PEST (C-terminal) que evita la degradación de la proteína^{282,283}. Dicha mutación identifica un nuevo subgrupo de pacientes de alto riesgo para los que el uso del Ac contra CCR7 podría suponer una nueva vía terapéutica. Lo mismo podemos argumentar para pacientes en los que la LLC se transforma y evoluciona a SR, pues en este grupo la activación no regulada de NOTCH-1 (30%) y las alteraciones de *TP53* (60%) son las lesiones genéticas más frecuentemente detectadas^{73,284}.

En LPLT, nuestros resultados también muestran como este tipo de Ac erradica de manera eficiente células de enfermedad refractaria a PNA y alemtuzumab. Estos resultados han sido recientemente corroborados por el Dr. Herling (Universidad de Colonia) en una nueva cohorte de 7 pacientes multitratados y resistentes. Aunque no podemos asociar la presencia de alteraciones citogenéticas en esta enfermedad con la eficacia de los Ac, los resultados aquí presentados dibujan un nuevo escenario para el tratamiento de la LPLT en recaída y/o refractaria en la que muy pocos pacientes siguen un curso exitoso tras la recaída. Los Ac contra CCR7 pueden constituir una segunda línea para pacientes que pierdan expresión de CD52 e incluso una primera línea para aquellos pacientes cuya densidad de CD52 en superficie no sea la adecuada para la terapia con alemtuzumab. La terapia combinada de forma simultánea o secuencial de ambos Ac es otra vía que puede ser considerada. Por último, tanto en LLC como en LPLT, los pacientes considerados frágiles necesitan opciones experimentales que no incluyan quimioterapia¹²⁴. Entre ellas está el uso de AcMo dada la baja toxicidad que habitualmente conlleva esta terapia, por ello, este grupo de pacientes también supone un nicho terapéutico para los AcMo contra CCR7.

2.2.5. Escenario clínico (I)

De acuerdo con los datos de la presente tesis, parece evidente que el futuro del Ac contra CCR7 para el tratamiento de las neoplasias linfoides B con expresión de CCR7 se centra en la LLC. Sin embargo, no podemos olvidar que el modelo animal de LCM agresivo ²⁴⁵ ha confirmado la utilidad de los Ac en esta entidad donde los pacientes tienen una media de supervivencia de 36-60 meses y muy limitadas opciones terapéuticas ¹⁹⁷. Además, toda neoplasia B que exprese el receptor, como el linfoma folicular, puede ser nicho del Ac⁵⁴.

A pesar de que el uso del AcMo para el tratamiento de neoplasias hematológicas se ha diversificado en la última década, se han desarrollado muy pocos Ac para el tratamiento de leucemias y linfomas de linaje T. Aparte de alemtuzumab (ya retirado para indicaciones en oncología), tan sólo encontramos mogamulizumab cuya diana es CCR4 y está indicado para LTA en recaída o refractaria ²⁸⁵. Por ello, otro de los nichos de este tipo de Ac son las neoplasias de linaje T. Aunque este estudio ha profundizado en LPLT, la terapia contra CCR7 podría ser aplicada a toda neoplasia T con expresión del CKR como el Síndrome de Sézary (SS) ²⁸⁶. Considerado por algunos autores como una variante de la LPLT ²⁸⁷, el SS también presenta un curso clínico agresivo con afectación de GL y MO. En este caso, datos propios (**Anexo III**) confirman la expresión de CCR7 en esta enfermedad y la eficacia *in vitro* del tratamiento con esta clase de Ac. Además, podría ser útil en el tratamiento de algunas LAL-T en las que la expresión de CCR7 se asocia a infiltración de SNC ⁵⁰.

Por último, en esta tesis mostramos como el uso de AcMo contra CCR7 afecta a la formación mediada por cortactina de estructuras corticales necesarias para procesos invasivos y aunque el efecto de la CDC *in vitro* mediado por estos AcMo contra células de CM u otro origen no es muy elevado, habrá que evaluar en modelos murinos cuál es el MDA más relevante y la eficacia real del uso de estos Ac en CM. Unos resultados positivos en dichos modelos *in vivo* abrirían una nueva puerta al tratamiento del tumor primario y de la metástasis no sólo en CM sino en un número considerable de patologías tumorales de origen epitelial ⁶⁸. De forma notable podemos destacar el melanoma uveal ⁶⁵ o el cáncer de páncreas ⁶⁷, dada las escasas opciones terapéuticas eficaces presentes en la actualidad y la gran agresividad clínica de las formas que expresan CCR7.

2.2.6. Escenario clínico (II)

Dado que la inducción, potencia y persistencia de la respuesta inmunitaria refleja la interacción compleja de diversas células inmunitarias con las células tumorales, es poco probable que el uso de un único agente en monoterapia favorezca la mayoría de los mecanismos que modulan las respuestas antitumorales. Por lo tanto, en un futuro -esperemos- no muy lejano, uno puede imaginar terapias en las que CCR7 actúe de forma combinada, secuencial o simultáneamente, con los más novedosos agentes inmunoterapéuticos. Algunos de estos agentes podrían ser i) Ac dirigidos contra otras dianas de la célula tumoral, ii) vacunas terapéuticas del cáncer, iii) inhibidores de tirosina quinasa (TKI), o iv) agentes inmunomoduladores que potencien la actividad antitumoral de los

sistemas inmunitarios adaptativo e innato. Como ejemplo de agentes inmunomoduladores podemos nombrar los Ac contra co-receptores como CTLA-4 (ipilimumab y tremelimumab), PD-1 (nivolumab), 4-1BB (urelumab); los Ac que bloquean los receptores inhibidores de las células NK; y las citocinas ^{193,288}. Todas estas posibles combinaciones tienen un mismo objetivo: inducir respuestas duraderas debido a la generación de memoria inmune antitumoral. En este escenario el Ac contra CCR7, además de mediar los MDA descritos, podría facilitar la captura de restos celulares unidos al propio Ac o procedentes de la muerte celular inducida por el Ac, promoviendo la captura de esos Ag tumorales por las APC y nuevas rondas de cebado de células T, generación de CTL específicos de Ag tumorales y la producción de nuevos Ac específicos de tumor derivados del propio hospedador y dirigidos contra diferentes Ag de la célula tumoral ¹⁹³. Para lograr este efecto tipo vacuna, que amplifica selectivamente la respuesta inmunitaria adaptativa contra el tumor ^{185,186}, es importante que el Ac desarrollado favorezca la señalización via FcγR activadores (FcγRIIA y FcγRIIIA) promoviendo así la maduración de las DC convencionales ¹⁹⁰. Otra aproximación, puede consistir en la coadministración junto con Ac bloqueantes del receptor inhibidor FcγRIIB, lo que conduce a una mayor presentación de Ag *in vitro* e *in vivo* ¹⁹¹.

A cis-immunologist will sometimes speak to a trans-immunologist; but the latter rarely answers

Niels Kaj Jerne

Conclusiones

1. CCR7 se presenta como una diana terapéutica novedosa y atractiva para evitar infiltración en tejido linfóide y metástasis en órgano distante que ha sido validada mediante el uso de inhibidores específicos de sus vías de señalización y un AcMo dirigido contra dominios extracelulares del receptor.
2. En LLC, los inhibidores de las vías PI3K/AKT y RhoA/ROCK afectan a la migración en gradientes de CCL19 y CCL21 mientras que los inhibidores de las vías PI3K/AKT, MEK/ERK y JNK afectan a la supervivencia celular inducida por los ligandos de CCR7.
3. El Ac contra CCR7 es una prometedora herramienta para la terapia del cáncer, con un mecanismo de acción doble y único entre los AcMo disponibles en la actualidad. Por un lado, actúa matando aquellas células que expresan el receptor, y por otro, bloquea la migración e invasión de estas células y por tanto su diseminación a nichos de supervivencia y de proliferación.
4. El Ac contra CCR7 tiene utilidad en pacientes de alto riesgo, multitratados y resistentes a los tratamientos de referencia actuales pues los niveles de expresión de la diana son elevados en los diferentes estadios de la enfermedad, independientemente de las líneas de tratamiento recibidas, y el MDA eluye los principales mecanismos de resistencia descritos.
5. El Ac contra CCR7 se presenta como una inmunoterapia con baja toxicidad potencial ya que la expresión del receptor es altamente específica de tejido, y con expresión limitada a ciertas subpoblaciones leucocitarias.
6. El Ac contra CCR7 tiene un potencial de uso extendido en el área de la oncología como demuestran los resultados obtenidos en LLC, LCM, LPLT y CM.

Bibliografía

1. Viola A, Luster AD. Chemokines and their receptors: drug targets in immunity and inflammation. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2008;48:171-197.
2. Scholten DJ, Canals M, Maussang D, Roumen L, Smit MJ, Wijtmans M, de Graaf C, Vischer HF, Leurs R. Pharmacological modulation of chemokine receptor function. *Br J Pharmacol.* 2012;165:1617-1643.
3. Lazennec G, Richmond A. Chemokines and chemokine receptors: new insights into cancer-related inflammation. *Trends Mol Med.* 2010;16:133-144.
4. Zlotnik A, Yoshie O. Chemokines: A new classification system and their role in immunity. *Immunity.* 2000;12:121-127.
5. Lechner MG, Russell SM, Bass RS, Epstein AL. Chemokines, costimulatory molecules and fusion proteins for the immunotherapy of solid tumors. *Immunotherapy.* 2011;3:1317-1340.
6. Viola A, Sarukhan A, Bronte V, Molon B. The pros and cons of chemokines in tumor immunology. *Trends Immunol.* 2012;33:496-504.
7. Belperio JA, Keane MP, Arenberg DA, Addison CL, Ehlert JE, Burdick MD, Strieter RM. CXC chemokines in angiogenesis. *J Leukoc Biol.* 2000;68:1-8.
8. Rajagopal S, Kim J, Ahn S, Craig S, Lam CM, Gerard NP, Gerard C, Lefkowitz RJ. Beta-arrestin- but not G protein-mediated signaling by the "decoy" receptor CXCR7. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107:628-632.
9. Mantovani A, Bonecchi R, Locati M. Tuning inflammation and immunity by chemokine sequestration: decoys and more. *Nat Rev Immunol.* 2006;6:907-918.
10. Jin T, Xu X, Hereld D. Chemotaxis, chemokine receptors and human disease. *Cytokine.* 2008;44:1-8.
11. Galvez BG, Genis L, Matias-Roman S, Oblander SA, Tryggvason K, Apte SS, Arroyo AG. Membrane type 1-matrix metalloproteinase is regulated by chemokines monocyte-chemoattractant protein-1/ccl2 and interleukin-8/CXCL8 in endothelial cells during angiogenesis. *J Biol Chem.* 2005;280:1292-1298.
12. Zlotnik A, Burkhardt AM, Homey B. Homeostatic chemokine receptors and organ-specific metastasis. *Nat Rev Immunol.* 2011;11:597-606.

13. Melero I, Rouzaut A, Motz GT, Coukos G. T-cell and NK-cell infiltration into solid tumors: a key limiting factor for efficacious cancer immunotherapy. *Cancer Discov.* 2014;4:522-526.
14. Birkenbach M, Josefsen K, Yalamanchili R, Lenoir G, Kieff E. Epstein-Barr virus-induced genes: first lymphocyte-specific G protein-coupled peptide receptors. *J Virol.* 1993;67:2209-2220.
15. Schweickart VL, Raport CJ, Godiska R, Byers MG, Eddy RL, Jr., Shows TB, Gray PW. Cloning of human and mouse EBI1, a lymphoid-specific G-protein-coupled receptor encoded on human chromosome 17q12-q21.2. *Genomics.* 1994;23:643-650.
16. Hedrick JA, Zlotnik A. Identification and characterization of a novel beta chemokine containing six conserved cysteines. *J Immunol.* 1997;159:1589-1593.
17. Yoshida R, Imai T, Hieshima K, Kusuda J, Baba M, Kitaura M, Nishimura M, Kakizaki M, Nomiyama H, Yoshie O. Molecular cloning of a novel human CC chemokine EBI1-ligand chemokine that is a specific functional ligand for EBI1, CCR7. *J Biol Chem.* 1997;272:13803-13809.
18. Nagira M, Imai T, Hieshima K, Kusuda J, Ridanpää M, Takagi S, Nishimura M, Kakizaki M, Nomiyama H, Yoshie O. Molecular cloning of a novel human CC chemokine secondary lymphoid-tissue chemokine that is a potent chemoattractant for lymphocytes and mapped to chromosome 9p13. *J Biol Chem.* 1997;272:19518-19524.
19. Sanchez-Sanchez N, Rioll-Blanco L, Rodriguez-Fernandez JL. The multiple personalities of the chemokine receptor CCR7 in dendritic cells. *J Immunol.* 2006;176:5153-5159.
20. Forster R, Schubel A, Breitfeld D, Kremmer E, Renner-Muller I, Wolf E, Lipp M. CCR7 coordinates the primary immune response by establishing functional microenvironments in secondary lymphoid organs. *Cell.* 1999;99:23-33.
21. Bromley SK, Thomas SY, Luster AD. Chemokine receptor CCR7 guides T cell exit from peripheral tissues and entry into afferent lymphatics. *Nat Immunol.* 2005;6:895-901.
22. Debes GF, Arnold CN, Young AJ, Krautwald S, Lipp M, Hay JB, Butcher EC. Chemokine receptor CCR7 required for T lymphocyte exit from peripheral tissues. *Nat Immunol.* 2005;6:889-894.
23. Baekkevold ES, Yamanaka T, Palframan RT, Carlsen HS, Reinholt FP, von Andrian UH, Brandtzaeg P, Haraldsen G. The CCR7 ligand elc (CCL19) is transcytosed in high endothelial venules and mediates T cell recruitment. *J Exp Med.* 2001;193:1105-1112.
24. Carlsen HS, Haraldsen G, Brandtzaeg P, Baekkevold ES. Disparate lymphoid chemokine expression in mice and men: no evidence of CCL21 synthesis by human high endothelial venules. *Blood.* 2005;106:444-446.

25. Gunn MD, Tangemann K, Tam C, Cyster JG, Rosen SD, Williams LT. A chemokine expressed in lymphoid high endothelial venules promotes the adhesion and chemotaxis of naive T lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95:258-263.
26. Willimann K, Legler DF, Loetscher M, Roos RS, Delgado MB, Clark-Lewis I, Baggiolini M, Moser B. The chemokine SLC is expressed in T cell areas of lymph nodes and mucosal lymphoid tissues and attracts activated T cells via CCR7. *Eur J Immunol*. 1998;28:2025-2034.
27. Ohl L, Mohaupt M, Czeloth N, Hintzen G, Kiafard Z, Zwirner J, Blankenstein T, Henning G, Forster R. CCR7 governs skin dendritic cell migration under inflammatory and steady-state conditions. *Immunity*. 2004;21:279-288.
28. Pham TH, Okada T, Matloubian M, Lo CG, Cyster JG. S1P1 receptor signaling overrides retention mediated by G alpha i-coupled receptors to promote T cell egress. *Immunity*. 2008;28:122-133.
29. Constantin G, Majeed M, Giagulli C, Piccio L, Kim JY, Butcher EC, Laudanna C. Chemokines trigger immediate b2 integrin affinity and mobility changes: differential regulation and roles in lymphocyte arrest under flow. *Immunity*. 2000;13:759-769.
30. Pachynski RK, Wu SW, Gunn MD, Erle DJ. Secondary lymphoid-tissue chemokine (SLC) stimulates integrin alpha 4 beta 7-mediated adhesion of lymphocytes to mucosal addressin cell adhesion molecule-1 (MAdCAM-1) under flow. *J Immunol*. 1998;161:952-956.
31. Gunn MD, Kyuwa S, Tam C, Kakiuchi T, Matsuzawa A, Williams LT, Nakano H. Mice lacking expression of secondary lymphoid organ chemokine have defects in lymphocyte homing and dendritic cell localization. *J Exp Med*. 1999;189:451-460.
32. Link A, Vogt TK, Favre S, Britschgi MR, Acha-Orbea H, Hinz B, Cyster JG, Luther SA. Fibroblastic reticular cells in lymph nodes regulate the homeostasis of naive T cells. *Nat Immunol*. 2007;8:1255-1265.
33. Wendland M, Willenzon S, Kocks J, Davalos-Misslitz AC, Hammerschmidt SI, Schumann K, Kremmer E, Sixt M, Hoffmeyer A, Pabst O, Forster R. Lymph node T cell homeostasis relies on steady state homing of dendritic cells. *Immunity*. 2011;35:945-957.
34. Warnock RA, Askari S, Butcher EC, Von Andrian UH. Molecular mechanisms of lymphocytes homing to peripheral lymph nodes. *J Exp Med*. 1998;187:205-216.
35. Campbell JJ, Bowman EP, Murphy K, Youngman KR, Siani MA, Thompson DA, Wu L, Zlotnik A, Butcher EC. 6-C-kine (SLC), a lymphocyte adhesion-triggering chemokine expressed by high endothelium, is an agonist for the MIP-3beta receptor CCR7. *J Cell Biol*. 1998;141:1053-1059.
36. Thelen M, Stein JV. How chemokines invite leukocytes to dance. *Nat Immunol*. 2008;9:953-959.

37. Hanada M, Feng J, Hemmings BA. Structure, regulation and function of PKB/AKT -a major therapeutic target. *Biochem Biophys Acta*. 2004;1697:3-16.
38. Turner SJ, Domin J, Waterfield MD, Ward SG, Westwick J. The CC chemokine monocyte chemotactic peptide-1 activates both the class I p85/p110 phosphatidylinositol 3-kinase and the class II PI3K-C2alpha. *J Biol Chem*. 1998;273:25987-25995.
39. Vicente-Manzanares M, Rey M, Jones DR, Sancho D, Mellado M, Rodriguez-Frade JM, del Pozo MA, Yanez-Mo M, de Ana AM, Martinez AC, Merida I, Sanchez-Madrid F. Involvement of phosphatidylinositol 3-kinase in stromal cell-derived factor-1 alpha-induced lymphocyte polarization and chemotaxis. *J Immunol*. 1999;163:4001-4012.
40. Reif K, Okkenhaug K, Sasaki T, Penninger JM, Vanhaesebroeck B, Cyster JG. Cutting edge: Differential roles for phosphoinositide 3-kinases, p110g and p110d, in lymphocyte chemotaxis and homing. *J Immunol*. 2004;173:2236-2240.
41. Ardeschna KM, Pizzey AR, Walker SJ, Devereux S, Khwaja A. The upregulation of CC chemokine receptor 7 and the increased migration of maturing dendritic cells to macrophage inflammatory protein 3b and secondary lymphoid chemokine is mediated by the p38 stress-activated protein kinase pathway. *Br J Haematol*. 2002;119:826-829.
42. Scandella E, Men Y, Legler DF, Gillessen S, Prikler L, Ludewig B, Groettrup M. CCL19/CCL21-triggered signal transduction and migration of dendritic cells requires prostaglandin E2. *Blood*. 2004;103:1595-1601.
43. Riol-Blanco N, Sanchez-Sanchez N, Torres A, Tejedor A, Narumiya S, Corbi AL, Sanchez-Mateos P, Rodriguez-Fernandez JL. The chemokine receptor CCR7 activates in dendritic cells two signaling modules that independently regulate chemotaxis and migratory speed. *J Immunol*. 2005;174:4070-4080.
44. Iijima N, Yanagawa Y, Clingan JM, Onoe K. CCR7-mediated c-Jun N-terminal kinase activation regulates cell migration in mature dendritic cells. *Int Immunol*. 2005;17:1201-1212.
45. Sanchez-Sanchez N, Riol-Blanco N, de la Rosa G, Puig-Kröger A, Garcia-Bordas J, Martin D, Longo N, Cuadrado A, Cabañas C, Corbi AL, Sanchez-Mateos P, Rodriguez-Fernandez JL. Chemokine receptor CCR7 induces intracellular signaling that inhibits apoptosis of mature dendritic cells. *Blood*. 2004;104:619-625.
46. Kim JW, Ferris RL, Whiteside TL. Chemokine C receptor 7 expression and protection of circulating CD8+ T lymphocytes from apoptosis. *Clin Cancer Res*. 2005;11:7901-7910.
47. Ishizaki H, Togawa A, Tanaka-Okamoto M, Hori K, Nishimura M, Hamaguchi A, Imai T, Takai Y, Miyoshi J. Defective chemokine-directed lymphocyte migration and development in the absence of Rho guanosine diphosphate-dissociation inhibitors alpha and beta. *J Immunol*. 2006;177:8512-8521.

48. Bardi G, Niggli V, Loetscher P. Rho kinase is required for CCR7-mediated polarization and chemotaxis of T lymphocytes. *FEBS Lett.* 2003;542:79-83.
49. Totsukawa G, Wu Y, Sasaki Y, Hartshorne DJ, Yamakita Y, Yamashiro S, Matsumura F. Distinct roles of MLCK and ROCK in the regulation of membrane protrusions and focal adhesion dynamics during cell migration of fibroblasts. *J Cell Biol.* 2004;164:427-439.
50. Buonamici S, Trimarchi T, Ruocco MG, Reavie L, Cathelin S, Mar BG, Klinakis A, Lukyanov Y, Tseng JC, Sen F, Gehrie E, Li M, Newcomb E, Zavadil J, Meruelo D, Lipp M, Ibrahim S, Efstratiadis A, Zagzag D, Bromberg JS, Dustin ML, Aifantis I. CCR7 signalling as an essential regulator of CNS infiltration in T-cell leukaemia. *Nature.* 2009;459:1000-1004.
51. Muller A, Sonkoly E, Eulert C, Gerber PA, Kubitza R, Schirlau K, Franken-Kunkel P, Poremba C, Snyderman C, Klotz LO, Ruzicka T, Bier H, Zlotnik A, Whiteside TL, Homey B, Hoffmann TK. Chemokine receptors in head and neck cancer: association with metastatic spread and regulation during chemotherapy. *Int J Cancer.* 2006;118:2147-2157.
52. Hasegawa H, Nomura T, Kohno M, Tateishi N, Suzuki Y, Maeda N, Fujisawa R, Yoshie O, Fujita S. Increased chemokine receptor CCR7/EBI1 expression enhances the infiltration of lymphoid organs by adult T-cell leukemia cells. *Blood.* 2000;95:30-38.
53. Kallinich T, Muche JM, Qin S, Sterry W, Audring H, Kroczeck RA. Chemokine receptor expression on neoplastic and reactive T cells in the skin at different stages of mycosis fungoides. *J Invest Dermatol.* 2003;121:1045-1052.
54. Lopez-Giral S, Quintana NE, Cabrerizo M, Alfonso-Perez M, Sala-Valdes M, De Soria VG, Fernandez-Ranada JM, Fernandez-Ruiz E, Munoz C. Chemokine receptors that mediate B cell homing to secondary lymphoid tissues are highly expressed in B cell chronic lymphocytic leukemia and non-Hodgkin lymphomas with widespread nodular dissemination. *J Leukoc Biol.* 2004;76:462-471.
55. Muller A, Homey B, Soto H, Ge N, Catron D, Buchanan ME, McClanahan T, Murphy E, Yuan W, Wagner SN, Barrera JL, Mohar A, Verastegui E, Zlotnik A. Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. *Nature.* 2001;410:50-56.
56. Wiley HE, Gonzalez EB, Maki W, Wu MT, Hwang ST. Expression of CC chemokine receptor-7 and regional lymph node metastasis of B16 murine melanoma. *J Natl Cancer Inst.* 2001;93:1638-1643.
57. Emmett MS, Lanati S, Dunn DB, Stone OA, Bates DO. CCR7 mediates directed growth of melanomas towards lymphatics. *Microcirculation.* 2011;18:172-182.
58. Shields JD, Fleury ME, Yong C, Tomei AA, Randolph GJ, Swartz MA. Autologous chemotaxis as a mechanism of tumor cell homing to lymphatics via interstitial flow and autocrine CCR7 signaling. *Cancer Cell.* 2007;11:526-538.

59. Wang J, Zhang X, Thomas SM, Grandis JR, Wells A, Chen ZG, Ferris RL. Chemokine receptor 7 activates phosphoinositide-3 kinase-mediated invasive and prosurvival pathways in head and neck cancer cells independent of EGFR. *Oncogene*. 2005;24:5897-5904.
60. Xu Y, Liu L, Qiu X, Liu Z, Li H, Li Z, Luo W, Wang E. CCL21/CCR7 prevents apoptosis via the ERK pathway in human non-small cell lung cancer cells. *PLoS One*. 2012;7:e33262.
61. Fang L, Lee VC, Cha E, Zhang H, Hwang ST. CCR7 regulates B16 murine melanoma cell tumorigenesis in skin. *J Leukoc Biol*. 2008;84:965-972.
62. Shields JD, Kourtis IC, Tomei AA, Roberts JM, Swartz MA. Induction of lymphoidlike stroma and immune escape by tumors that express the chemokine CCL21. *Science*. 2010;328:749-752.
63. Cabioglu N, Yazici MS, Arun B, Broglio KR, Hortobagyi GN, Price JE, Sahin A. CCR7 and CXCR4 as novel biomarkers predicting axillary lymph node metastasis in T1 breast cancer. *Clin Cancer Res*. 2005;11:5686-5693.
64. Takeuchi H, Fujimoto A, Tanaka M, Yamano T, Hsueh E, Hoon DS. CCL21 chemokine regulates chemokine receptor CCR7 bearing malignant melanoma cells. *Clin Cancer Res*. 2004;10:2351-2358.
65. van den Bosch T, Koopmans AE, Vaarwater J, van den Berg M, de Klein A, Verdijk RM. Chemokine receptor CCR7 expression predicts poor outcome in uveal melanoma and relates to liver metastasis whereas expression of CXCR4 is not of clinical relevance. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2013;54:7354-7361.
66. Takanami I. Overexpression of CCR7 mRNA in nonsmall cell lung cancer: correlation with lymph node metastasis. *Int J Cancer*. 2003;105:186-189.
67. Zhao B, Cui K, Wang CL, Wang AL, Zhang B, Zhou WY, Zhao WH, Li S. The chemotactic interaction between CCL21 and its receptor, CCR7, facilitates the progression of pancreatic cancer via induction of angiogenesis and lymphangiogenesis. *J Hepatobiliary Pancreat Sci*. 2011.
68. Legler DF, Uetz-von Allmen E, Hauser MA. CCR7: roles in cancer cell dissemination, migration and metastasis formation. *Int J Biochem Cell Biol*. 2014;54:78-82.
69. Chiorazzi N, Rai KR, Ferrarini M. Chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med*. 2005;352:804-815.
70. Rai KR, Sawitsky A, Cronkite EP, Chanana AD, Levy RN, Pasternack BS. Clinical staging of chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 1975;46:219-234.

71. Binet JL, Auquier A, Dighiero G, Chastang C, Piguët H, Goasguen J, Vaugier G, Potron G, Colona P, Oberling F, Thomas M, Tchernia G, Jacquillat C, Boivin P, Lesty C, Duault MT, Monconduit M, Belabbes S, Gremy F. A new prognostic classification of chronic lymphocytic leukemia derived from a multivariate survival analysis. *Cancer*. 1981;48:198-206.
72. Zenz T, Mertens D, Kupperts R, Dohner H, Stilgenbauer S. From pathogenesis to treatment of chronic lymphocytic leukaemia. *Nat Rev Cancer*. 2010;10:37-50.
73. Rossi D, Gaidano G. Richter syndrome: molecular insights and clinical perspectives. *Hematol Oncol*. 2009;27:1-10.
74. Gaidano G, Foa R, Dalla-Favera R. Molecular pathogenesis of chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Invest*. 2012;122:3432-3438.
75. Sagatys EM, Zhang L. Clinical and laboratory prognostic indicators in chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Control*. 2012;19:18-25.
76. Chiorazzi N, Ferrarini M. Cellular origin(s) of chronic lymphocytic leukemia: cautionary notes and additional considerations and possibilities. *Blood*. 2011 117:1781-1791.
77. Garcia-Munoz R, Galiacho VR, Llorente L. Immunological aspects in chronic lymphocytic leukemia (CLL) development. *Ann Hematol*. 2012;91:981-996.
78. Herve M, Xu K, Ng YS, Wardemann H, Albesiano E, Messmer BT, Chiorazzi N, Meffre E. Unmutated and mutated chronic lymphocytic leukemias derive from self-reactive B cell precursors despite expressing different antibody reactivity. *J Clin Invest*. 2005;115:1636-1643.
79. Kipps TJ, Carson DA. Autoantibodies in chronic lymphocytic leukemia and related systemic autoimmune diseases. *Blood*. 1993;81:2475-2487.
80. Klein U, Tu Y, Stolovitzky GA, Mattioli M, Cattoretti G, Husson H, Freedman A, Inghirami G, Cro L, Baldini L, Neri A, Califano A, Dalla-Favera R. Gene expression profiling of B cell chronic lymphocytic leukemia reveals a homogeneous phenotype related to memory B cells. *J Exp Med*. 2001;194:1625-1638.
81. Chiorazzi N, Ferrarini M. B cell chronic lymphocytic leukemia: lessons learned from studies of the B cell antigen receptor. *Annu Rev Immunol*. 2003;21:841-894.
82. Nemazee D. Receptor editing in lymphocyte development and central tolerance. *Nat Rev Immunol*. 2006;6:728-740.
83. Goodnow CC. Balancing immunity and tolerance: deleting and tuning lymphocyte repertoires. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996;93:2264-2271.

84. Hippen KL, Tze LE, Behrens TW. CD5 maintains tolerance in anergic B cells. *J Exp Med*. 2000;191:883-890.
85. Perez-Chacon G, Vargas JA, Jorda J, Alvarez N, Martin-Donaire T, Rosado S, Losada-Fernandez I, Rebolledo N, Perez-Aciego P. CD5 does not regulate the signaling triggered through BCR in B cells from a subset of B-CLL patients. *Leuk Lymphoma*. 2007;48:147-157.
86. Perez-Chacon G, Vargas JA, Jorda J, Morado M, Rosado S, Martin-Donaire T, Losada-Fernandez I, Rebolledo N, Perez-Aciego P. CD5 provides viability signals to B cells from a subset of B-CLL patients by a mechanism that involves PKC. *Leuk Res*. 2007;31:183-193.
87. Zapata JM, Krajewska M, Morse HC, 3rd, Choi Y, Reed JC. TNF receptor-associated factor (TRAF) domain and Bcl-2 cooperate to induce small B cell lymphoma/chronic lymphocytic leukemia in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101:16600-16605.
88. Perez-Chacon G, Llobet D, Pardo C, Pindado J, Choi Y, Reed JC, Zapata JM. TNFR-associated factor 2 deficiency in B lymphocytes predisposes to chronic lymphocytic leukemia/small lymphocytic lymphoma in mice. *J Immunol*. 2012;189:1053-1061.
89. Burger JA. Nurture versus nature: the microenvironment in chronic lymphocytic leukemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2011;2011:96-103.
90. Kurtova AV, Balakrishnan K, Chen R, Ding W, Schnabl S, Quiroga MP, Sivina M, Wierda WG, Estrov Z, Keating MJ, Shehata M, Jager U, Gandhi V, Kay NE, Plunkett W, Burger JA. Diverse marrow stromal cells protect CLL cells from spontaneous and drug-induced apoptosis: development of a reliable and reproducible system to assess stromal cell adhesion-mediated drug resistance. *Blood*. 2009;114:4441-4450.
91. Panayiotidis P, Jones D, Ganeshaguru K, Foroni L, Hoffbrand AV. Human bone marrow stromal cells prevent apoptosis and support the survival of chronic lymphocytic leukaemia cells in vitro. *Br J Haematol*. 1996;92:97-103.
92. Lagneaux L, Delforge A, Bron D, De Bruyn C, Stryckmans P. Chronic lymphocytic leukemic B cells but not normal B cells are rescued from apoptosis by contact with normal bone marrow stromal cells. *Blood*. 1998;91:2387-2396.
93. Burger JA, Tsukada N, Burger M, Zvaifler NJ, Dell'Aquila M, Kipps TJ. Blood-derived nurse-like cells protect chronic lymphocytic leukemia B cells from spontaneous apoptosis through stromal cell-derived factor-1. *Blood*. 2000;96:2655-2663.
94. Ghia P, Strola G, Granziero L, Geuna M, Guida G, Sallusto F, Ruffing N, Montagna L, Piccoli P, Chilosi M, Caligaris-Cappio F. Chronic lymphocytic leukemia B cells are endowed with the capacity to attract CD4+, CD40L+ T cells by producing CCL22. *Eur J Immunol*. 2002;32:1403-1413.

95. Burger JA, Quiroga MP, Hartmann E, Burkle A, Wierda WG, Keating MJ, Rosenwald A. High-level expression of the T-cell chemokines CCL3 and CCL4 by chronic lymphocytic leukemia B cells in nurselike cell cocultures and after BCR stimulation. *Blood*. 2009;113:3050-3058.
96. Pedersen IM, Kitada S, Leoni LM, Zapata JM, Karras JG, Tsukada N, Kipps TJ, Choi YS, Bennett F, Reed JC. Protection of CLL B cells by a follicular dendritic cell line is dependent on induction of Mcl-1. *Blood*. 2002;100:1795-1801.
97. Hillmen P. Using the biology of chronic lymphocytic leukemia to choose treatment. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2011;2011:104-109.
98. Messmer BT, Messmer D, Allen SL, Kolitz JE, Kudalkar P, Cesar D, Murphy EJ, Koduru P, Ferrarini M, Zupo S, Cutrona G, Damle RN, Wasil T, Rai KR, Hellerstein MK, Chiorazzi N. In vivo measurements document the dynamic cellular kinetics of chronic lymphocytic leukemia B cells. *J Clin Invest*. 2005;115:755-764.
99. Schmid C, Isaacson PG. Proliferation centres in B-cell malignant lymphoma, lymphocytic (B-CLL): an immunophenotypic study. *Histopathology*. 1994;24:445-451.
100. Dohner H, Stilgenbauer S, Benner A, Leupolt E, Krober A, Bullinger L, Dohner K, Bentz M, Lichter P. Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med*. 2000;343:1910-1916.
101. Caporaso N, Goldin L, Plass C, Calin G, Marti G, Bauer S, Raveche E, McMaster ML, Ng D, Landgren O, Slager S. Chronic lymphocytic leukaemia genetics overview. *Br J Haematol*. 2007;139:630-634.
102. Loscertales J, Arranz E, Sanz MA, Blas C, Gil-Fernandez JJ, Burgaleta C, Alegre A. Clonal evolution in patients with chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Lymphoma*. 2010;51:1142-1143.
103. Calin GA, Dumitru CD, Shimizu M, Bichi R, Zupo S, Noch E, Aldler H, Rattan S, Keating M, Rai K, Rassenti L, Kipps T, Negrini M, Bullrich F, Croce CM. Frequent deletions and down-regulation of micro- RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99:15524-15529.
104. Cimmino A, Calin GA, Fabbri M, Iorio MV, Ferracin M, Shimizu M, Wojcik SE, Aqeilan RI, Zupo S, Dono M, Rassenti L, Alder H, Volinia S, Liu CG, Kipps TJ, Negrini M, Croce CM. miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102:13944-13949.
105. Fegan C, Robinson H, Thompson P, Whittaker JA, White D. Karyotypic evolution in CLL: identification of a new sub-group of patients with deletions of 11q and advanced or progressive disease. *Leukemia*. 1995;9:2003-2008.

106. Dohner H, Stilgenbauer S, James MR, Benner A, Weilguni T, Bentz M, Fischer K, Hunstein W, Lichter P. 11q deletions identify a new subset of B-cell chronic lymphocytic leukemia characterized by extensive nodal involvement and inferior prognosis. *Blood*. 1997;89:2516-2522.
107. Rossi D, Gaidano G. ATM and chronic lymphocytic leukemia: mutations, and not only deletions, matter. *Haematologica*. 2012;97:5-8.
108. Malcikova J, Smardova J, Rocnova L, Tichy B, Kuglik P, Vranova V, Cejkova S, Svitakova M, Skuhrova Francova H, Brychtova Y, Doubek M, Brejcha M, Klabusay M, Mayer J, Pospisilova S, Trbusek M. Monoallelic and biallelic inactivation of TP53 gene in chronic lymphocytic leukemia: selection, impact on survival, and response to DNA damage. *Blood*. 2009;114:5307-5314.
109. Chiaretti S, Tavoraro S, Marinelli M, Messina M, Del Giudice I, Mauro FR, Santangelo S, Picicocchi A, Peragine N, Truong S, Patten N, Ghia EM, Torrente I, De Propriis MS, Nanni M, Lawrence J, Guarini A, Foa R. Evaluation of TP53 mutations with the AmpliChip p53 research test in chronic lymphocytic leukemia: correlation with clinical outcome and gene expression profiling. *Genes Chromosomes Cancer*. 2011;50:263-274.
110. Zenz T, Krober A, Scherer K, Habe S, Buhler A, Benner A, Denzel T, Winkler D, Edelmann J, Schwanen C, Dohner H, Stilgenbauer S. Monoallelic TP53 inactivation is associated with poor prognosis in chronic lymphocytic leukemia: results from a detailed genetic characterization with long-term follow-up. *Blood*. 2008;112:3322-3329.
111. Dohner H, Fischer K, Bentz M, Hansen K, Benner A, Cabot G, Diehl D, Schlenk R, Coy J, Stilgenbauer S, et al. p53 gene deletion predicts for poor survival and non-response to therapy with purine analogs in chronic B-cell leukemias. *Blood*. 1995;85:1580-1589.
112. Zenz T, Eichhorst B, Busch R, Denzel T, Habe S, Winkler D, Buhler A, Edelmann J, Bergmann M, Hopfinger G, Hensel M, Hallek M, Dohner H, Stilgenbauer S. TP53 mutation and survival in chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol*. 2010;28:4473-4479.
113. Gonzalez D, Martinez P, Wade R, Hockley S, Oscier D, Matutes E, Dearden CE, Richards SM, Catovsky D, Morgan GJ. Mutational status of the TP53 gene as a predictor of response and survival in patients with chronic lymphocytic leukemia: results from the LRF CLL4 trial. *J Clin Oncol*. 2011;29:2223-2229.
114. Catovsky D, Richards S, Matutes E, Oscier D, Dyer MJ, Bezares RF, Pettitt AR, Hamblin T, Milligan DW, Child JA, Hamilton MS, Dearden CE, Smith AG, Bosanquet AG, Davis Z, Brito-Babapulle V, Else M, Wade R, Hillmen P. Assessment of fludarabine plus cyclophosphamide for patients with chronic lymphocytic leukaemia (the LRF CLL4 Trial): a randomised controlled trial. *Lancet*. 2007;370:230-239.
115. Hallek M, Fischer K, Fingerle-Rowson G, Fink AM, Busch R, Mayer J, Hensel M, Hopfinger G, Hess G, von Grunhagen U, Bergmann M, Catalano J, Zinzani PL, Caligaris-Cappio F, Seymour JF, Berrebi A, Jager U, Cazin B, Trnecny M, Westermann A, Wendtner CM, Eichhorst BF, Staib P, Buhler A, Winkler D, Zenz T, Bottcher S, Ritgen M, Mendila M, Kneba M, Dohner H, Stilgenbauer

S. Addition of rituximab to fludarabine and cyclophosphamide in patients with chronic lymphocytic leukaemia: a randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet*. 2010;376:1164-1174.

116. Robak T, Dmoszynska A, Solal-Celigny P, Warzocha K, Loscertales J, Catalano J, Afanasiev BV, Larratt L, Geisler CH, Montillo M, Zyuzgin I, Ganly PS, Dartigeas C, Rosta A, Maurer J, Mendila M, Saville MW, Valente N, Wenger MK, Moiseev SI. Rituximab plus fludarabine and cyclophosphamide prolongs progression-free survival compared with fludarabine and cyclophosphamide alone in previously treated chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol*. 2010;28:1756-1765.

117. Stilgenbauer S, Zenz T. Understanding and managing ultra high-risk chronic lymphocytic leukemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2010;2010:481-488.

118. Woyach JA, Johnson AJ, Byrd JC. The B-cell receptor signaling pathway as a therapeutic target in CLL. *Blood*. 2012;120:1175-1184.

119. Delgado J, Espinet B, Oliveira AC, Abrisqueta P, de la Serna J, Collado R, Loscertales J, Lopez M, Hernandez-Rivas JA, Ferra C, Ramirez A, Roncero JM, Lopez C, Aventin A, Puiggros A, Abella E, Carbonell F, Costa D, Carrio A, Gonzalez M. Chronic lymphocytic leukaemia with 17p deletion: a retrospective analysis of prognostic factors and therapy results. *Br J Haematol*. 2012;157:67-74.

120. Stilgenbauer S, Sander S, Bullinger L, Benner A, Leupolt E, Winkler D, Krober A, Kienle D, Lichter P, Dohner H. Clonal evolution in chronic lymphocytic leukemia: acquisition of high-risk genomic aberrations associated with unmutated VH, resistance to therapy, and short survival. *Haematologica*. 2007;92:1242-1245.

121. Zenz T, Habe S, Denzel T, Mohr J, Winkler D, Buhler A, Sarno A, Groner S, Mertens D, Busch R, Hallek M, Dohner H, Stilgenbauer S. Detailed analysis of p53 pathway defects in fludarabine-refractory chronic lymphocytic leukemia (CLL): dissecting the contribution of 17p deletion, TP53 mutation, p53-p21 dysfunction, and miR34a in a prospective clinical trial. *Blood*. 2009;114:2589-2597.

122. Gribben JG. How I treat CLL up front. *Blood*. 2010;115:187-197.

123. Keating MJ, O'Brien S, Kontoyiannis D, Plunkett W, Koller C, Beran M, Lerner S, Kantarjian H. Results of first salvage therapy for patients refractory to a fludarabine regimen in chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Lymphoma*. 2002;43:1755-1762.

124. Brown JR. The treatment of relapsed refractory chronic lymphocytic leukemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2011;2011:110-118.

125. Hallek M, Cheson BD, Catovsky D, Caligaris-Cappio F, Dighiero G, Dohner H, Hillmen P, Keating MJ, Montserrat E, Rai KR, Kipps TJ. Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic lymphocytic leukemia: a report from the International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia updating the National Cancer Institute-Working Group 1996 guidelines. *Blood*. 2008;111:5446-5456.

126. Tsimberidou AM, Keating MJ. Treatment of fludarabine-refractory chronic lymphocytic leukemia. *Cancer*. 2009;115:2824-2836.
127. Keating MJ, O'Brien S, Lerner S, Koller C, Beran M, Robertson LE, Freireich EJ, Estey E, Kantarjian H. Long-term follow-up of patients with chronic lymphocytic leukemia (CLL) receiving fludarabine regimens as initial therapy. *Blood*. 1998;92:1165-1171.
128. Ghobrial IM, Bone ND, Stenson MJ, Novak A, Hedin KE, Kay NE, Ansell SM. Expression of the chemokine receptors CXCR4 and CCR7 and disease progression in B-cell chronic lymphocytic leukemia/ small lymphocytic lymphoma. *Mayo Clin Proc*. 2004;79:318-325.
129. Redondo-Munoz J, Jose Terol M, Garcia-Marco JA, Garcia-Pardo A. Matrix metalloproteinase-9 is up-regulated by CCL21/CCR7 interaction via extracellular signal-regulated kinase-1/2 signaling and is involved in CCL21-driven B-cell chronic lymphocytic leukemia cell invasion and migration. *Blood*. 2008;111:383-386.
130. Till KJ, Lin K, Zuzel M, Cawley JC. The chemokine receptor CCR7 and alpha4 integrin are important for migration of chronic lymphocytic leukemia cells into lymph nodes. *Blood*. 2002;99:2977-2984.
131. Till KJ, Spiller DG, Harris RJ, Chen H, Zuzel M, Cawley JC. CLL, but not normal, B cells are dependent on autocrine VEGF and alpha4beta1 integrin for chemokine-induced motility on and through endothelium. *Blood*. 2005;105:4813-4819.
132. Richardson SJ, Matthews C, Catherwood MA, Alexander HD, Carey BS, Farrugia J, Gardiner A, Mould S, Oscier D, Copplestone JA, Prentice AG. ZAP-70 expression is associated with enhanced ability to respond to migratory and survival signals in B-cell chronic lymphocytic leukemia (B-CLL). *Blood*. 2006;107:3584-3592.
133. Calpe E, Codony C, Baptista MJ, Abrisqueta P, Carpio C, Purroy N, Bosch F, Crespo M. ZAP-70 enhances migration of malignant B lymphocytes toward CCL21 by inducing CCR7 expression via IgM-ERK1/2 activation. *Blood*. 2011;118:4401-4410.
134. Ticchioni M, Essafi M, Jeandel PY, Davi F, Cassuto JP, Deckert M, Bernard A. Homeostatic chemokines increase survival of B-chronic lymphocytic leukemia cells through inactivation of transcription factor FOXO3a. *Oncogene*. 2007;26:7081-7091.
135. Hu C, Xiong J, Zhang L, Huang B, Zhang Q, Li Q, Yang M, Wu Y, Wu Q, Shen Q, Gao Q, Zhang K, Sun Z, Liu J, Jin Y, Tan J. PEG10 activation by co-stimulation of CXCR5 and CCR7 essentially contributes to resistance to apoptosis in CD19+CD34+ B cells from patients with B cell lineage acute and chronic lymphocytic leukemia. *Cell Mol Immunol*. 2004;1:280-294.
136. Bertilaccio MT, Scielzo C, Simonetti G, Ten Hacken E, Apollonio B, Ghia P, Caligaris-Cappio F. Xenograft models of chronic lymphocytic leukemia: problems, pitfalls and future directions. *Leukemia*. 2013;27:534-540.

137. Bichi R, Shinton SA, Martin ES, Koval A, Calin GA, Cesari R, Russo G, Hardy RR, Croce CM. Human chronic lymphocytic leukemia modeled in mouse by targeted TCL1 expression. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99:6955-6960.
138. Klein U, Lia M, Crespo M, Siegel R, Shen Q, Mo T, Ambesi-Impiombato A, Califano A, Migliazza A, Bhagat G, Dalla-Favera R. The DLEU2/miR-15a/16-1 cluster controls B cell proliferation and its deletion leads to chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Cell*. 2010;17:28-40.
139. Herling M, Khoury JD, Washington LT, Duvic M, Keating MJ, Jones D. A systematic approach to diagnosis of mature T-cell leukemias reveals heterogeneity among WHO categories. *Blood*. 2004;104:328-335.
140. Dearden C. How I treat prolymphocytic leukemia. *Blood*. 2012;120:538-551.
141. Dearden C. B- and T-cell prolymphocytic leukemia: antibody approaches. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2012;2012:645-651.
142. Herling M, Patel KA, Teitell MA, Konopleva M, Ravandi F, Kobayashi R, Jones D. High TCL1 expression and intact T-cell receptor signaling define a hyperproliferative subset of T-cell prolymphocytic leukemia. *Blood*. 2008;111:328-337.
143. Dearden CE, Matutes E, Cazin B, Tjonnfjord GE, Parreira A, Nomdedeu B, Leoni P, Clark FJ, Radia D, Rassam SM, Roques T, Ketterer N, Brito-Babapulle V, Dyer MJ, Catovsky D. High remission rate in T-cell prolymphocytic leukemia with CAMPATH-1H. *Blood*. 2001;98:1721-1726.
144. Maljaei SH, Brito-Babapulle V, Hiorns LR, Catovsky D. Abnormalities of chromosomes 8, 11, 14, and X in T-prolymphocytic leukemia studied by fluorescence in situ hybridization. *Cancer Genet Cytogenet*. 1998;103:110-116.
145. Brito-Babapulle V, Catovsky D. Inversions and tandem translocations involving chromosome 14q11 and 14q32 in T-prolymphocytic leukemia and T-cell leukemias in patients with ataxia telangiectasia. *Cancer Genet Cytogenet*. 1991;55:1-9.
146. Pekarsky Y, Hallas C, Isobe M, Russo G, Croce CM. Abnormalities at 14q32.1 in T cell malignancies involve two oncogenes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;96:2949-2951.
147. Stern MH, Soulier J, Rosenzweig M, Nakahara K, Canki-Klain N, Aurias A, Sigaux F, Kirsch IR. MTCP-1: a novel gene on the human chromosome Xq28 translocated to the T cell receptor alpha/delta locus in mature T cell proliferations. *Oncogene*. 1993;8:2475-2483.
148. Gritti C, Dastot H, Soulier J, Janin A, Daniel MT, Madani A, Grimber G, Briand P, Sigaux F, Stern MH. Transgenic mice for MTCP1 develop T-cell prolymphocytic leukemia. *Blood*. 1998;92:368-373.

149. Virgilio L, Lazzeri C, Bichi R, Nibu K, Narducci MG, Russo G, Rothstein JL, Croce CM. Deregulated expression of TCL1 causes T cell leukemia in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95:3885-3889.
150. Pawson R, Dyer MJ, Barge R, Matutes E, Thornton PD, Emmett E, Kluin-Nelemans JC, Fibbe WE, Willemze R, Catovsky D. Treatment of T-cell prolymphocytic leukemia with human CD52 antibody. *J Clin Oncol*. 1997;15:2667-2672.
151. Dearden CE, Khot A, Else M, Hamblin M, Grand E, Roy A, Hewamana S, Matutes E, Catovsky D. Alemtuzumab therapy in T-cell prolymphocytic leukemia: comparing efficacy in a series treated intravenously and a study piloting the subcutaneous route. *Blood*. 2011;118:5799-5802.
152. Ravandi F, Aribi A, O'Brien S, Faderl S, Jones D, Ferrajoli A, Huang X, York S, Pierce S, Wierda W, Kontoyiannis D, Verstovsek S, Pro B, Fayad L, Keating M, Kantarjian H. Phase II study of alemtuzumab in combination with pentostatin in patients with T-cell neoplasms. *J Clin Oncol*. 2009;27:5425-5430.
153. Hopfinger G, Busch R, Pflug N, Weit N, Westermann A, Fink AM, Cramer P, Reinart N, Winkler D, Fingerle-Rowson G, Stilgenbauer S, Dohner H, Kandler G, Eichhorst B, Hallek M, Herling M. Sequential chemoimmunotherapy of fludarabine, mitoxantrone, and cyclophosphamide induction followed by alemtuzumab consolidation is effective in T-cell prolymphocytic leukemia. *Cancer*. 2013;119:2258-2267.
154. Wiktor-Jedrzejczak W, Dearden C, de Wreede L, van Biezen A, Brinch L, Leblond V, Brune M, Volin L, Kazmi M, Nagler A, Schetelig J, de Witte T, Dreger P. Hematopoietic stem cell transplantation in T-prolymphocytic leukemia: a retrospective study from the European Group for Blood and Marrow Transplantation and the Royal Marsden Consortium. *Leukemia*. 2012;26:972-976.
155. Domingo L, Salas D, Zubizarreta R, Bare M, Sarriugarte G, Barata T, Ibanez J, Blanch J, Puig-Vives M, Fernandez A, Castells X, Sala M. Tumor phenotype and breast density in distinct categories of interval cancer: results of population-based mammography screening in Spain. *Breast Cancer Res*. 2014;16:R3.
156. Fisher B, Slack NH. Number of lymph nodes examined and the prognosis of breast carcinoma. *Surg Gynecol Obstet*. 1970;131:79-88.
157. Keegan TH, Press DJ, Tao L, DeRouen MC, Kurian AW, Clarke CA, Gomez SL. Impact of breast cancer subtypes on 3-year survival among adolescent and young adult women. *Breast Cancer Res*. 2013;15:R95.
158. Liu Y, Ji R, Li J, Gu Q, Zhao X, Sun T, Wang J, Du Q, Sun B. Correlation effect of EGFR and CXCR4 and CCR7 chemokine receptors in predicting breast cancer metastasis and prognosis. *J Exp Clin Cancer Res*. 2010;29:16.
159. Wilson JL, Burchell J, Grimshaw MJ. Endothelins induce CCR7 expression by breast tumor cells via endothelin receptor A and hypoxia-inducible factor-1. *Cancer Res*. 2006;66:11802-11807.

160. Cunningham HD, Shannon LA, Calloway PA, Fassold BC, Dunwiddie I, Vielhauer G, Zhang M, Vines CM. Expression of the C-C chemokine receptor 7 mediates metastasis of breast cancer to the lymph nodes in mice. *Transl Oncol.* 2010;3:354-361.
161. Boyle ST, Ingman WV, Poltavets V, Faulkner JW, Whitfield RJ, McColl SR, Kochetkova M. The chemokine receptor CCR7 promotes mammary tumorigenesis through amplification of stem-like cells. *Oncogene.* 2015.
162. Tutunea-Fatan E, Majumder M, Xin X, Lala PK. The role of CCL21/CCR7 chemokine axis in breast cancer-induced lymphangiogenesis. *Mol Cancer.* 2015;14:35.
163. Li F, Zou Z, Suo N, Zhang Z, Wan F, Zhong G, Qu Y, Ntaka KS, Tian H. CCL21/CCR7 axis activating chemotaxis accompanied with epithelial-mesenchymal transition in human breast carcinoma. *Med Oncol.* 2014;31:180.
164. Su ML, Chang TM, Chiang CH, Chang HC, Hou MF, Li WS, Hung WC. Inhibition of chemokine (C-C motif) receptor 7 sialylation suppresses CCL19-stimulated proliferation, invasion and anti-apoptosis. *PLoS One.* 2014;9:e98823.
165. Kirkwood JM, Butterfield LH, Tarhini AA, Zarour H, Kalinski P, Ferrone S. Immunotherapy of cancer in 2012. *CA Cancer J Clin.* 2012;62:309-335.
166. Kohler G, Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature.* 1975;256:495-497.
167. Jiang XR, Song A, Bergelson S, Arroll T, Parekh B, May K, Chung S, Strouse R, Mire-Sluis A, Schenerman M. Advances in the assessment and control of the effector functions of therapeutic antibodies. *Nat Rev Drug Discov.* 2011;10:101-111.
168. Chan AC, Carter PJ. Therapeutic antibodies for autoimmunity and inflammation. *Nat Rev Immunol.* 2010;10:301-316.
169. Weiner LM, Surana R, Wang S. Monoclonal antibodies: versatile platforms for cancer immunotherapy. *Nat Rev Immunol.* 2010;10:317-327.
170. Dunkelberger JR, Song WC. Complement and its role in innate and adaptive immune responses. *Cell Res.* 2010;20:34-50.
171. Nimmerjahn F, Ravetch JV. Fcγ receptors as regulators of immune responses. *Nat Rev Immunol.* 2008;8:34-47.
172. Roopenian DC, Akilesh S. FcRn: the neonatal Fc receptor comes of age. *Nat Rev Immunol.* 2007;7:715-725.

173. Raju TS. Terminal sugars of Fc glycans influence antibody effector functions of IgGs. *Curr Opin Immunol.* 2008;20:471-478.
174. Chan HT, Hughes D, French RR, Tutt AL, Walshe CA, Teeling JL, Glennie MJ, Cragg MS. CD20-induced lymphoma cell death is independent of both caspases and its redistribution into triton X-100 insoluble membrane rafts. *Cancer Res.* 2003;63:5480-5489.
175. Honeychurch J, Alduaij W, Azizyan M, Cheadle EJ, Pelicano H, Ivanov A, Huang P, Cragg MS, Illidge TM. Antibody-induced nonapoptotic cell death in human lymphoma and leukemia cells is mediated through a novel reactive oxygen species-dependent pathway. *Blood.* 2012;119:3523-3533.
176. Buchsbaum DJ, Forero-Torres A, LoBuglio AF. TRAIL-receptor antibodies as a potential cancer treatment. *Future Oncol.* 2007;3:405-409.
177. Kim R. Cetuximab and panitumumab: are they interchangeable? *Lancet Oncol.* 2009;10:1140-1141.
178. Willett CG, Boucher Y, di Tomaso E, Duda DG, Munn LL, Tong RT, Chung DC, Sahani DV, Kalva SP, Kozin SV, Mino M, Cohen KS, Scadden DT, Hartford AC, Fischman AJ, Clark JW, Ryan DP, Zhu AX, Blaszkowsky LS, Chen HX, Shellito PC, Lauwers GY, Jain RK. Direct evidence that the VEGF-specific antibody bevacizumab has antivascular effects in human rectal cancer. *Nat Med.* 2004;10:145-147.
179. Zhang L, Gajewski TF, Kline J. PD-1/PD-L1 interactions inhibit antitumor immune responses in a murine acute myeloid leukemia model. *Blood.* 2009;114:1545-1552.
180. Mitsui J, Nishikawa H, Muraoka D, Wang L, Noguchi T, Sato E, Kondo S, Allison JP, Sakaguchi S, Old LJ, Kato T, Shiku H. Two distinct mechanisms of augmented antitumor activity by modulation of immunostimulatory/inhibitory signals. *Clin Cancer Res.* 2010;16:2781-2791.
181. Weigelin B, Bolanos E, Teijeira A, Martinez-Forero I, Labiano S, Azpilikueta A, Morales-Kastresana A, Quetglas JI, Wagena E, Sanchez-Paulete AR, Chen L, Friedl P, Melero I. Focusing and sustaining the antitumor CTL effector killer response by agonist anti-CD137 mAb. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2015;112:7551-7556.
182. Cragg MS, Glennie MJ. Antibody specificity controls in vivo effector mechanisms of anti-CD20 reagents. *Blood.* 2004;103:2738-2743.
183. Racila E, Link BK, Weng WK, Witzig TE, Ansell S, Maurer MJ, Huang J, Dahle C, Halwani A, Levy R, Weiner GJ. A polymorphism in the complement component C1qA correlates with prolonged response following rituximab therapy of follicular lymphoma. *Clin Cancer Res.* 2008;14:6697-6703.

184. Idusogie EE, Wong PY, Presta LG, Gazzano-Santoro H, Totpal K, Ultsch M, Mulkerrin MG. Engineered antibodies with increased activity to recruit complement. *J Immunol.* 2001;166:2571-2575.
185. Selenko N, Maidic O, Draxier S, Berer A, Jager U, Knapp W, Stockl J. CD20 antibody (C2B8)-induced apoptosis of lymphoma cells promotes phagocytosis by dendritic cells and cross-priming of CD8+ cytotoxic T cells. *Leukemia.* 2001;15:1619-1626.
186. Dhodapkar KM, Krasovsky J, Williamson B, Dhodapkar MV. Antitumor monoclonal antibodies enhance cross-presentation of cellular antigens and the generation of myeloma-specific killer T cells by dendritic cells. *J Exp Med.* 2002;195:125-133.
187. Cartron G, Dacheux L, Salles G, Solal-Celigny P, Bardos P, Colombat P, Watier H. Therapeutic activity of humanized anti-CD20 monoclonal antibody and polymorphism in IgG Fc receptor FcγRIIIa gene. *Blood.* 2002;99:754-758.
188. Musolino A, Naldi N, Bortesi B, Pezzuolo D, Capelletti M, Missale G, Laccabue D, Zerbini A, Camisa R, Bisagni G, Neri TM, Ardizzoni A. Immunoglobulin G fragment C receptor polymorphisms and clinical efficacy of trastuzumab-based therapy in patients with HER-2/neu-positive metastatic breast cancer. *J Clin Oncol.* 2008;26:1789-1796.
189. Weiner LM, Dhodapkar MV, Ferrone S. Monoclonal antibodies for cancer immunotherapy. *Lancet.* 2009;373:1033-1040.
190. Regnault A, Lankar D, Lacabanne V, Rodriguez A, Thery C, Rescigno M, Saito T, Verbeek S, Bonnerot C, Ricciardi-Castagnoli P, Amigorena S. Fcγ receptor-mediated induction of dendritic cell maturation and major histocompatibility complex class I-restricted antigen presentation after immune complex internalization. *J Exp Med.* 1999;189:371-380.
191. Dhodapkar KM, Kaufman JL, Ehlers M, Banerjee DK, Bonvini E, Koenig S, Steinman RM, Ravetch JV, Dhodapkar MV. Selective blockade of inhibitory Fcγ receptor enables human dendritic cell maturation with IL-12p70 production and immunity to antibody-coated tumor cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005;102:2910-2915.
192. Kalergis AM, Ravetch JV. Inducing tumor immunity through the selective engagement of activating Fcγ receptors on dendritic cells. *J Exp Med.* 2002;195:1653-1659.
193. Weiner LM, Murray JC, Shuptrine CW. Antibody-based immunotherapy of cancer. *Cell.* 2012;148:1081-1084.
194. Campbell DH, deFazio A, Sutherland RL, Daly RJ. Expression and tyrosine phosphorylation of EMS1 in human breast cancer cell lines. *Int J Cancer.* 1996;68:485-492.
195. Ren XD, Schwartz MA. Determination of GTP loading on Rho. *Methods Enzymol.* 2000;325:264-272.

196. van Rijn RS, Simonetti ER, Hagenbeek A, Hogenes MC, de Weger RA, Canninga-van Dijk MR, Weijer K, Spits H, Storm G, van Bloois L, Rijkers G, Martens AC, Ebeling SB. A new xenograft model for graft-versus-host disease by intravenous transfer of human peripheral blood mononuclear cells in RAG2^{-/-} gammac^{-/-} double-mutant mice. *Blood*. 2003;102:2522-2531.
197. Vose JM. Mantle cell lymphoma: 2015 update on diagnosis, risk-stratification, and clinical management. *Am J Hematol*. 2015;90:739-745.
198. Tam CS, O'Brien S, Lerner S, Khouri I, Ferrajoli A, Faderl S, Browning M, Tsimberidou AM, Kantarjian H, Wierda WG. The natural history of fludarabine-refractory chronic lymphocytic leukemia patients who fail alemtuzumab or have bulky lymphadenopathy. *Leuk Lymphoma*. 2007;48:1931-1939.
199. Proudfoot AE, Handel TM, Johnson Z, Lau EK, LiWang P, Clark-Lewis I, Borlat F, Wells TN, Kosco-Vilbois MH. Glycosaminoglycan binding and oligomerization are essential for the in vivo activity of certain chemokines. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100:1885-1890.
200. Weed SA, Karginov AV, Schafer DA, Weaver AM, Kinley AW, Cooper JA, Parsons JT. Cortactin localization to sites of actin assembly in lamellipodia requires interactions with F-actin and the Arp2/3 complex. *J Cell Biol*. 2000;151:29-40.
201. Clark ES, Whigham AS, Yarbrough WG, Weaver AM. Cortactin is an essential regulator of matrix metalloproteinase secretion and extracellular matrix degradation in invadopodia. *Cancer Res*. 2007;67:4227-4235.
202. Artym VV, Zhang Y, Seillier-Moiseiwitsch F, Yamada KM, Mueller SC. Dynamic interactions of cortactin and membrane type 1 matrix metalloproteinase at invadopodia: defining the stages of invadopodia formation and function. *Cancer Res*. 2006;66:3034-3043.
203. Weaver AM. Cortactin in tumor invasiveness. *Cancer Lett*. 2008;265:157-166.
204. Kwan J, Killeen N. CCR7 directs the migration of thymocytes into the thymic medulla. *J Immunol*. 2004;172:3999-4007.
205. Ueno T, Saito F, Gray DH, Kuse S, Hieshima K, Nakano H, Kakiuchi T, Lipp M, Boyd RL, Takahama Y. CCR7 signals are essential for cortex-medulla migration of developing thymocytes. *J Exp Med*. 2004;200:493-505.
206. Misslitz A, Pabst O, Hintzen G, Ohl L, Kremmer E, Petrie HT, Forster R. Thymic T cell development and progenitor localization depend on CCR7. *J Exp Med*. 2004;200:481-491.
207. Cowan JE, McCarthy NI, Parnell SM, White AJ, Bacon A, Serge A, Irla M, Lane PJ, Jenkinson EJ, Jenkinson WE, Anderson G. Differential requirement for CCR4 and CCR7 during the development of innate and adaptive alphabetaT cells in the adult thymus. *J Immunol*. 2014;193:1204-1212.

208. Alon R, Feigelson SW. Chemokine signaling to lymphocyte integrins under shear flow. *Microcirculation*. 2009;16:3-16.
209. Fruman DA, Bismuth G. Fine tuning the immune response with PI3K. *Immunol Rev*. 2009;228:253-272.
210. Haessler U, Pisano M, Wu M, Swartz MA. Dendritic cell chemotaxis in 3D under defined chemokine gradients reveals differential response to ligands CCL21 and CCL19. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108:5614-5619.
211. Catusse J, Leick M, Groch M, Clark DJ, Buchner MV, Zirlik K, Burger M. Role of the atypical chemoattractant receptor CCR4 in regulating CCL19 induced CCR7 responses in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Mol Cancer*. 2011;9:297.
212. Wu H, Yan Y, Backer JM. Regulation of class IA PI3Ks. *Biochem Soc Trans*. 2007;35:242-244.
213. Vicente-Manzanares M, Cabrero JR, Rey M, Perez-Martinez M, Ursa A, Itoh K, Sanchez-Madrid F. A role for the Rho-p160 Rho coiled-coil kinase axis in the chemokine stromal cell-derived factor-1 alpha-induced lymphocyte actomyosin and microtubular organization and chemotaxis. *J Immunol*. 2002;168:400-410.
214. Redondo-Munoz J, Escobar-Diaz E, Samaniego R, Terol MJ, Garcia-Marco JA, Garcia-Pardo A. MMP-9 in B-cell chronic lymphocytic leukemia is up-regulated by alpha4beta1 integrin or CXCR4 engagement via distinct signaling pathways, localizes to podosomes, and is involved in cell invasion and migration. *Blood*. 2006;108:3143-3151.
215. Bryce NS, Clark ES, Leysath JL, Currie JD, Webb DJ, Weaver AM. Cortactin promotes cell motility by enhancing lamellipodial persistence. *Curr Biol*. 2005;15:1276-1285.
216. Boguslavsky S, Grosheva I, Landau E, Shtutman M, Cohen M, Arnold K, Feinstein E, Geiger B, Bershadsky A. p120 catenin regulates lamellipodial dynamics and cell adhesion in cooperation with cortactin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104:10882-10887.
217. Ayala I, Baldassarre M, Giacchetti G, Caldieri G, Tete S, Luini A, Buccione R. Multiple regulatory inputs converge on cortactin to control invadopodia biogenesis and extracellular matrix degradation. *J Cell Sci*. 2008;121:369-378.
218. Schuurin E, Verhoeven E, Mooi WJ, Michalides RJ. Identification and cloning of two overexpressed genes, U21B31/PRAD1 and EMS1, within the amplified chromosome 11q13 region in human carcinomas. *Oncogene*. 1992;7:355-361.
219. Li Y, Tondravi M, Liu J, Smith E, Haudenschild CC, Kaczmarek M, Zhan X. Cortactin potentiates bone metastasis of breast cancer cells. *Cancer Res*. 2001;61:6906-6911.

220. Rosich L, Montraveta A, Xargay-Torrent S, Lopez-Guerra M, Roldan J, Aymerich M, Salaverria I, Bea S, Campo E, Perez-Galan P, Roue G, Colomer D. Dual PI3K/mTOR inhibition is required to effectively impair microenvironment survival signals in mantle cell lymphoma. *Oncotarget*. 2014;5:6788-6800.
221. Matas-Cespedes A, Rodriguez V, Kalko SG, Vidal-Crespo A, Rosich L, Casserras T, Balsas P, Villamor N, Gine E, Campo E, Roue G, Lopez-Guillermo A, Colomer D, Perez-Galan P. Disruption of follicular dendritic cells-follicular lymphoma cross-talk by the pan-PI3K inhibitor BKM120 (Buparlisib). *Clin Cancer Res*. 2014;20:3458-3471.
222. Hashimoto M, Suizu F, Tokuyama W, Noguchi H, Hirata N, Matsuda-Lennikov M, Edamura T, Masuzawa M, Gotoh N, Tanaka S, Noguchi M. Protooncogene TCL1b functions as an Akt kinase co-activator that exhibits oncogenic potency in vivo. *Oncogenesis*. 2013;2:e70.
223. Ponzoni M, Doglioni C, Caligaris-Cappio F. Chronic lymphocytic leukemia: the pathologist's view of lymph node microenvironment. *Semin Diagn Pathol*. 2011;28:161-166.
224. Okada T, Ngo VN, Ekland EH, Forster R, Lipp M, Littman DR, Cyster JG. Chemokine requirements for B cell entry to lymph nodes and Peyer's patches. *J Exp Med*. 2002;196:65-75.
225. Braun A, Worbs T, Moschovakis GL, Halle S, Hoffmann K, Bolter J, Munk A, Forster R. Afferent lymph-derived T cells and DCs use different chemokine receptor CCR7-dependent routes for entry into the lymph node and intranodal migration. *Nat Immunol*. 2011;12:879-887.
226. Vela M, Aris M, Llorente M, Garcia-Sanz JA, Kremer L. Chemokine receptor-specific antibodies in cancer immunotherapy: achievements and challenges. *Front Immunol*. 2015;6:12.
227. Kremer L, Marquez G. Generation of monoclonal antibodies against chemokine receptors. *Methods Mol Biol*. 2004;239:243-260.
228. Hutchings CJ, Koglin M, Marshall FH. Therapeutic antibodies directed at G protein-coupled receptors. *MAbs*. 2010;2:594-606.
229. Furman RR, Sharman JP, Coutre SE, Cheson BD, Pagel JM, Hillmen P, Barrientos JC, Zelenetz AD, Kipps TJ, Flinn I, Ghia P, Eradat H, Ervin T, Lamanna N, Coiffier B, Pettitt AR, Ma S, Stilgenbauer S, Cramer P, Aiello M, Johnson DM, Miller LL, Li D, Jahn TM, Dansey RD, Hallek M, O'Brien SM. Idelalisib and Rituximab in Relapsed Chronic Lymphocytic Leukemia. *N Engl J Med*. 2014.
230. Xia Y, Cai XY, Fan JQ, Zhang LL, Ren JH, Chen J, Li ZY, Zhang RG, Zhu F, Wu G. Rho Kinase Inhibitor Fasudil Suppresses the Vasculogenic Mimicry of B16 Mouse Melanoma Cells Both In Vitro and In Vivo. *Mol Cancer Ther*. 2015;14:1582-1590.
231. Wermke M, Camgoz A, Paszkowski-Rogacz M, Thieme S, von Bonin M, Dahl A, Platzbecker U, Theis M, Ehninger G, Brenner S, Bornhauser M, Buchholz F. RNAi profiling of

primary human AML cells identifies ROCK1 as a therapeutic target and nominates fasudil as an antileukemic drug. *Blood*. 2015;125:3760-3768.

232. Jain N, Curran E, Iyengar NM, Diaz-Flores E, Kunnavakkam R, Popplewell L, Kirschbaum MH, Karrison T, Erba HP, Green M, Poire X, Koval G, Shannon K, Reddy PL, Joseph L, Atallah EL, Dy P, Thomas SP, Smith SE, Doyle LA, Stadler WM, Larson RA, Stock W, Odenike O. Phase II study of the oral MEK inhibitor selumetinib in advanced acute myelogenous leukemia: a University of Chicago phase II consortium trial. *Clin Cancer Res*. 2013;20:490-498.

233. Crassini K, Stevenson WS, Mulligan SP, Best OG. The MEK1/2 inhibitor, MEKi-1, induces cell death in Chronic Lymphocytic Leukemia cells under conditions that mimic the tumor microenvironment and is synergistic with fludarabine. *Leuk Lymphoma*. 2015:1-29.

234. Kahl BS, Spurgeon SE, Furman RR, Flinn IW, Coutre SE, Brown JR, Benson DM, Byrd JC, Peterman S, Cho Y, Yu A, Godfrey WR, Wagner-Johnston ND. A phase 1 study of the PI3Kdelta inhibitor idelalisib in patients with relapsed/refractory mantle cell lymphoma (MCL). *Blood*. 2014;123:3398-3405.

235. Yang Q, Modi P, Newcomb T, Queva C, Gandhi V. Idelalisib: First-in-Class PI3K Delta Inhibitor for the Treatment of Chronic Lymphocytic Leukemia, Small Lymphocytic Leukemia, and Follicular Lymphoma. *Clin Cancer Res*. 2015;21:1537-1542.

236. Gockeritz E, Kerwien S, Baumann M, Wigger M, Vondey V, Neumann L, Landwehr T, Wendtner CM, Klein C, Liu N, Hallek M, Frenzel LP, Krause G. Efficacy of phosphatidylinositol-3 kinase inhibitors with diverse isoform selectivity profiles for inhibiting the survival of chronic lymphocytic leukemia cells. *Int J Cancer*. 2015.

237. Chang BY, Francesco M, De Rooij MF, Magadala P, Steggerda SM, Huang MM, Kuil A, Herman SE, Chang S, Pals ST, Wilson W, Wiestner A, Spaargaren M, Buggy JJ, Elias L. Egress of CD19(+)CD5(+) cells into peripheral blood following treatment with the Bruton tyrosine kinase inhibitor ibrutinib in mantle cell lymphoma patients. *Blood*. 2013;122:2412-2424.

238. Dudal S, Subramanian K, Flandre T, Law WS, Lowe PJ, Skerjanec A, Genin JC, Duval M, Piequet A, Cordier A, Jarai G, Van Heeke G, Taplin S, Krantz C, Jones S, Warren AP, Brennan FR, Sims J, Lloyd P. Integrated pharmacokinetic, pharmacodynamic and immunogenicity profiling of an anti-CCL21 monoclonal antibody in cynomolgus monkeys. *MAbs*. 2015;7:829-837.

239. Beckman RA, von Roemeling R, Scott AM. Monoclonal antibody dose determination and biodistribution into solid tumors. *Ther Deliv*. 2011;2:333-344.

240. Jaglowski SM, Alinari L, Lapalombella R, Muthusamy N, Byrd JC. The clinical application of monoclonal antibodies in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2010;116:3705-3714.

241. Wierda WG, Kipps TJ, Mayer J, Stilgenbauer S, Williams CD, Hellmann A, Robak T, Furman RR, Hillmen P, Trneny M, Dyer MJ, Padmanabhan S, Piotrowska M, Kozak T, Chan G, Davis R, Losic N, Wilms J, Russell CA, Osterborg A. Ofatumumab as single-agent CD20

immunotherapy in fludarabine-refractory chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol*. 2010;28:1749-1755.

242. Rawstron AC, Kennedy B, Moreton P, Dickinson AJ, Cullen MJ, Richards SJ, Jack AS, Hillmen P. Early prediction of outcome and response to alemtuzumab therapy in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2004;103:2027-2031.

243. Yang J, Wang S, Zhao G, Sun B. Effect of chemokine receptors CCR7 on disseminated behavior of human T cell lymphoma: clinical and experimental study. *J Exp Clin Cancer Res*. 2011;30:51.

244. Guo N, Liu F, Yang L, Huang J, Ding X, Sun C. Chemokine receptor 7 enhances cell chemotaxis and migration of metastatic squamous cell carcinoma of head and neck through activation of matrix metalloproteinase-9. *Oncol Rep*. 2014;32:794-800.

245. Somovilla-Crespo B, Alfonso-Perez M, Cuesta-Mateos C, Carballo-de Dios C, Beltran AE, Terron F, Perez-Villar JJ, Gamallo-Amat C, Perez-Chacon G, Fernandez-Ruiz E, Zapata JM, Munoz-Calleja C. Anti-CCR7 therapy exerts a potent anti-tumor activity in a xenograft model of human mantle cell lymphoma. *J Hematol Oncol*. 2013;6:89.

246. Cuesta-Mateos C, Lopez-Giral S, Alfonso-Perez M, de Soria VG, Loscertales J, Guasch-Vidal S, Beltran AE, Zapata JM, Munoz-Calleja C. Analysis of migratory and prosurvival pathways induced by the homeostatic chemokines CCL19 and CCL21 in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Exp Hematol*. 2010;38:756-764, 764 e751-754.

247. Cuesta-Mateos C, Loscertales J, Kreutzman A, Colom-Fernandez B, Portero-Sainz I, Perez-Villar JJ, Terron F, Munoz-Calleja C. Preclinical activity of anti-CCR7 immunotherapy in patients with high-risk chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Immunol Immunother*. 2015;64:665-676.

248. Alfonso-Perez M, Lopez-Giral S, Quintana NE, Loscertales J, Martin-Jimenez P, Munoz C. Anti-CCR7 monoclonal antibodies as a novel tool for the treatment of chronic lymphocyte leukemia. *J Leukoc Biol*. 2006;79:1157-1165.

249. Kubota T, Niwa R, Satoh M, Akinaga S, Shitara K, Hanai N. Engineered therapeutic antibodies with improved effector functions. *Cancer Sci*. 2009;100:1566-1572.

250. Shinkawa T, Nakamura K, Yamane N, Shoji-Hosaka E, Kanda Y, Sakurada M, Uchida K, Anazawa H, Satoh M, Yamasaki M, Hanai N, Shitara K. The absence of fucose but not the presence of galactose or bisecting N-acetylglucosamine of human IgG1 complex-type oligosaccharides shows the critical role of enhancing antibody-dependent cellular cytotoxicity. *J Biol Chem*. 2003;278:3466-3473.

251. Mossner E, Brunker P, Moser S, Puntener U, Schmidt C, Herter S, Grau R, Gerdes C, Nopora A, van Puijenbroek E, Ferrara C, Sondermann P, Jager C, Strein P, Fertig G, Friess T, Schull C, Bauer S, Dal Porto J, Del Nagro C, Dabbagh K, Dyer MJ, Poppema S, Klein C, Umana P. Increasing the

efficacy of CD20 antibody therapy through the engineering of a new type II anti-CD20 antibody with enhanced direct and immune effector cell-mediated B-cell cytotoxicity. *Blood*. 2010;115:4393-4402.

252. Di Gaetano N, Xiao Y, Erba E, Bassan R, Rambaldi A, Golay J, Introna M. Synergism between fludarabine and rituximab revealed in a follicular lymphoma cell line resistant to the cytotoxic activity of either drug alone. *Br J Haematol*. 2001;114:800-809.

253. Wu L, Adams M, Carter T, Chen R, Muller G, Stirling D, Schafer P, Bartlett JB. lenalidomide enhances natural killer cell and monocyte-mediated antibody-dependent cellular cytotoxicity of rituximab-treated CD20+ tumor cells. *Clin Cancer Res*. 2008;14:4650-4657.

254. Gertner-Dardenne J, Bonnafous C, Bezombes C, Capietto AH, Scaglione V, Ingoure S, Cendron D, Gross E, Lepage JF, Quillet-Mary A, Ysebaert L, Laurent G, Sicard H, Fournie JJ. Bromohydrin pyrophosphate enhances antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity induced by therapeutic antibodies. *Blood*. 2009;113:4875-4884.

255. Despouy G, Joiner M, Le Toriellec E, Weil R, Stern MH. The TCL1 oncoprotein inhibits activation-induced cell death by impairing PKC θ and ERK pathways. *Blood*. 2007;110:4406-4416.

256. Herman SE, Gordon AL, Hertlein E, Ramanunni A, Zhang X, Jaglowski S, Flynn J, Jones J, Blum KA, Buggy JJ, Hamdy A, Johnson AJ, Byrd JC. Bruton tyrosine kinase represents a promising therapeutic target for treatment of chronic lymphocytic leukemia and is effectively targeted by PCI-32765. *Blood*. 2011;117:6287-6296.

257. Sakaguchi S. Naturally arising CD4+ regulatory t cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses. *Annu Rev Immunol*. 2004;22:531-562.

258. Schneider MA, Meingassner JG, Lipp M, Moore HD, Rot A. CCR7 is required for the in vivo function of CD4+ CD25+ regulatory T cells. *J Exp Med*. 2007;204:735-745.

259. Campbell DJ, Koch MA. Phenotypical and functional specialization of FOXP3+ regulatory T cells. *Nat Rev Immunol*. 2010;11:119-130.

260. Kawakami Y, Rosenberg SA. Human tumor antigens recognized by T-cells. *Immunol Res*. 1997;16:313-339.

261. Sugiyama D, Nishikawa H, Maeda Y, Nishioka M, Tanemura A, Katayama I, Ezoe S, Kanakura Y, Sato E, Fukumori Y, Karbach J, Jager E, Sakaguchi S. Anti-CCR4 mAb selectively depletes effector-type FoxP3+CD4+ regulatory T cells, evoking antitumor immune responses in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013;110:17945-17950.

262. Nishikawa H, Sakaguchi S. Regulatory T cells in tumor immunity. *Int J Cancer*. 2010;127:759-767.

263. Beyer M, Kochanek M, Darabi K, Popov A, Jensen M, Endl E, Knolle PA, Thomas RK, von Bergwelt-Baildon M, Debey S, Hallek M, Schultze JL. Reduced frequencies and suppressive function of CD4+CD25hi regulatory T cells in patients with chronic lymphocytic leukemia after therapy with fludarabine. *Blood*. 2005;106:2018-2025.
264. Kim JM, Rasmussen JP, Rudensky AY. Regulatory T cells prevent catastrophic autoimmunity throughout the lifespan of mice. *Nat Immunol*. 2007;8:191-197.
265. Suarez N, Alfaro C, Dubrot J, Palazon A, Bolanos E, Erro L, Hervas-Stubbs S, Martinez-Forero I, Morales-Kastresana A, Martin-Algarra S, Sangro B, Lecanda F, Perez-Gracia JL, Gonzalez A, Melero I. Synergistic effects of CTLA-4 blockade with tremelimumab and elimination of regulatory T lymphocytes in vitro and in vivo. *Int J Cancer*. 2011;129:374-386.
266. Patten PE, Buggins AG, Richards J, Wotherspoon A, Salisbury J, Mufti GJ, Hamblin TJ, Devereux S. CD38 expression in chronic lymphocytic leukemia is regulated by the tumor microenvironment. *Blood*. 2008;111:5173-5181.
267. Bagnara D, Kaufman MS, Calissano C, Marsilio S, Patten PE, Simone R, Chum P, Yan XJ, Allen SL, Kolitz JE, Baskar S, Rader C, Mellstedt H, Rabbani H, Lee A, Gregersen PK, Rai KR, Chiorazzi N. A novel adoptive transfer model of chronic lymphocytic leukemia suggests a key role for T lymphocytes in the disease. *Blood*. 2011;117:5463-5472.
268. Stilgenbauer S, Zenz T, Winkler D, Buhler A, Schlenk RF, Groner S, Busch R, Hensel M, Duhren U, Finke J, Dreger P, Jager U, Lengfelder E, Hohloch K, Soling U, Schlag R, Kneba M, Hallek M, Dohner H. Subcutaneous alemtuzumab in fludarabine-refractory chronic lymphocytic leukemia: clinical results and prognostic marker analyses from the CLL2H study of the German Chronic Lymphocytic Leukemia Study Group. *J Clin Oncol*. 2009;27:3994-4001.
269. Corcione A, Ferlito F, Gattorno M, Gregorio A, Pistorio A, Gastaldi R, Gambini C, Martini A, Traggiai E, Pistoia V. Phenotypic and functional characterization of switch memory B cells from patients with oligoarticular juvenile idiopathic arthritis. *Arthritis Res Ther*. 2009;11:R150.
270. Payne D, Drinkwater S, Baretto R, Duddridge M, Browning MJ. Expression of chemokine receptors CXCR4, CXCR5 and CCR7 on B and T lymphocytes from patients with primary antibody deficiency. *Clin Exp Immunol*. 2009;156:254-262.
271. Hopken UE, Achtman AH, Kruger K, Lipp M. Distinct and overlapping roles of CXCR5 and CCR7 in B-1 cell homing and early immunity against bacterial pathogens. *J Leukoc Biol*. 2004;76:709-718.
272. Sixt M, Kanazawa N, Selg M, Samson T, Roos G, Reinhardt DP, Pabst R, Lutz MB, Sorokin L. The conduit system transports soluble antigens from the afferent lymph to resident dendritic cells in the T cell area of the lymph node. *Immunity*. 2005;22:19-29.

273. Henning G, Ohl L, Junt T, Reiterer P, Brinkmann V, Nakano H, Hohenberger W, Lipp M, Forster R. CC chemokine receptor 7-dependent and -independent pathways for lymphocyte homing: modulation by FTY720. *J Exp Med*. 2001;194:1875-1881.
274. Scimone ML, Felbinger TW, Mazo IB, Stein JV, Von Andrian UH, Weninger W. CXCL12 mediates CCR7-independent homing of central memory cells, but not naive T cells, in peripheral lymph nodes. *J Exp Med*. 2004;199:1113-1120.
275. Dieu-Nosjean MC, Antoine M, Danel C, Heudes D, Wislez M, Poulot V, Rabbe N, Laurans L, Tartour E, de Chaisemartin L, Lebecque S, Fridman WH, Cadranel J. Long-term survival for patients with non-small-cell lung cancer with intratumoral lymphoid structures. *J Clin Oncol*. 2008;26:4410-4417.
276. Pimenta EM, Barnes BJ. Role of Tertiary Lymphoid Structures (TLS) in Anti-Tumor Immunity: Potential Tumor-Induced Cytokines/Chemokines that Regulate TLS Formation in Epithelial-Derived Cancers. *Cancers (Basel)*. 2014;6:969-997.
277. Damas JK, Smith C, Oie E, Fevang B, Halvorsen B, Waehre T, Boullier A, Breland U, Yndestad A, Ovchinnikova O, Robertson AK, Sandberg WJ, Kjekshus J, Taskén K, Froland SS, Gullestad L, Hansson GK, Quehenberger O, Aukrust P. Enhanced expression of the homeostatic chemokines CCL19 and CCL21 in clinical and experimental atherosclerosis: possible pathogenic role in plaque destabilization. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2007;27:614-620.
278. Kharfan-Dabaja MA, Wierda WG, Cooper LJ. Immunotherapy for chronic lymphocytic leukemia in the era of BTK inhibitors. *Leukemia*. 2014;28:507-517.
279. Huhn D, von Schilling C, Wilhelm M, Ho AD, Hallek M, Kuse R, Knauf W, Riedel U, Hinke A, Srock S, Serke S, Peschel C, Emmerich B. Rituximab therapy of patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2001;98:1326-1331.
280. Austen B, Skowronska A, Baker C, Powell JE, Gardiner A, Oscier D, Majid A, Dyer M, Siebert R, Taylor AM, Moss PA, Stankovic T. Mutation status of the residual ATM allele is an important determinant of the cellular response to chemotherapy and survival in patients with chronic lymphocytic leukemia containing an 11q deletion. *J Clin Oncol*. 2007;25:5448-5457.
281. Verner J, Trbusek M, Chovancova J, Jaskova Z, Moulis M, Folber F, Halouzka R, Mayer J, Pospisilova S, Doubek M. NOD/SCID IL2Rgamma-null mouse xenograft model of human p53-mutated chronic lymphocytic leukemia and ATM-mutated mantle cell lymphoma using permanent cell lines. *Leuk Lymphoma*. 2015:1-9.
282. Sportoletti P, Baldoni S, Cavalli L, Del Papa B, Bonifacio E, Ciurnelli R, Bell AS, Di Tommaso A, Rosati E, Crescenzi B, Mecucci C, Screpanti I, Marconi P, Martelli MF, Di Ianni M, Falzetti F. NOTCH1 PEST domain mutation is an adverse prognostic factor in B-CLL. *Br J Haematol*. 2010;151:404-406.

283. Fabbri G, Rasi S, Rossi D, Trifonov V, Khiabani H, Ma J, Grunn A, Fangazio M, Capello D, Monti S, Cresta S, Gargiulo E, Forconi F, Guarini A, Arcaini L, Paulli M, Laurenti L, Larocca LM, Marasca R, Gattei V, Oscier D, Bertoni F, Mullighan CG, Foa R, Pasqualucci L, Rabadan R, Dalla-Favera R, Gaidano G. Analysis of the chronic lymphocytic leukemia coding genome: role of NOTCH1 mutational activation. *J Exp Med*. 2011;208:1389-1401.
284. Rossi D, Spina V, Deambrogi C, Rasi S, Laurenti L, Stamatopoulos K, Arcaini L, Lucioni M, Rocque GB, Xu-Monette ZY, Visco C, Chang J, Chigrinova E, Forconi F, Marasca R, Besson C, Papadaki T, Paulli M, Larocca LM, Pileri SA, Gattei V, Bertoni F, Foa R, Young KH, Gaidano G. The genetics of Richter syndrome reveals disease heterogeneity and predicts survival after transformation. *Blood*. 2011;117:3391-3401.
285. Subramaniam JM, Whiteside G, McKeage K, Croxtall JC. Mogamulizumab: first global approval. *Drugs*. 2012;72:1293-1298.
286. Foucar K. Mature T-cell leukemias including T-prolymphocytic leukemia, adult T-cell leukemia/lymphoma, and Sezary syndrome. *Am J Clin Pathol*. 2007;127:496-510.
287. Pawson R, Matutes E, Brito-Babapulle V, Maljaie H, Hedges M, Mercieca J, Dyer M, Catovsky D. Sezary cell leukaemia: a distinct T cell disorder or a variant form of T prolymphocytic leukaemia? *Leukemia*. 1997;11:1009-1013.
288. Melero I, Berman DM, Aznar MA, Korman AJ, Gracia JL, Haanen J. Evolving synergistic combinations of targeted immunotherapies to combat cancer. *Nat Rev Cancer*. 2015;15:457-472.

Anexos

Publicaciones científicas del doctorando durante su tesis doctoral

Artículos elaborados y relacionados con su tesis doctoral

Analysis of migratory and prosurvival pathways induced by the homeostatic chemokines CCL19 and CCL21 in B-cell chronic lymphocytic leukemia. **Cuesta-Mateos C**, López-Giral S, Alfonso-Pérez M, de Soria VG, Loscertales J, Guasch-Vidal S, Beltrán AE, Zapata JM, Muñoz-Calleja C. Exp Hematol. 2010 Sep;38(9):756-64. **Anexo I**

Anti-CCR7 therapy exerts a potent anti-tumor activity in a xenograft model of human mantle cell lymphoma. Somovilla-Crespo B, Alfonso-Pérez M, **Cuesta-Mateos C**, Carballo-de Dios C, Beltrán AE, Terrón F, Pérez-Villar JJ, Gamallo-Amat C, Pérez-Chacón G, Fernández-Ruiz E, Zapata JM, Muñoz-Calleja C. J Hematol Oncol. 2013 Dec 4;6:89.

Preclinical activity of anti-CCR7 immunotherapy in patients with high-risk chronic lymphocytic leukemia. **Cuesta-Mateos C**, Loscertales J, Kreutzman A, Colom-Fernández B, Portero-Sáinz I, Pérez-Villar JJ, Terrón F, Muñoz-Calleja C. Cancer Immunol Immunother. 2015 Jun;64(6):665-76. doi: 10.1007/s00262-015-1670-z. Epub 2015 Feb 28. **Anexo II**

Cortactin controls CCR7-dependent motility of breast cancer cells. **Cuesta-Mateos C**, Somovilla-Crespo B, Colom-Fernández B, Kreutzman A, Martínez-Quiles N, Terrón F, Zapata JM, Muñoz-Calleja C. 2015. En revisión. **Anexo III**

CCR7 as a novel therapeutic target in T-prolymphocytic leukemia. **Cuesta-Mateos C**, Loscertales J, Kreutzman A, Terrón F, Muñoz-Calleja C. En revisión. **Anexo IV**

Artículos elaborados y no relacionados con su tesis doctoral

Autoantibodies against TIF-1-gamma and CADM-140 in Spanish patients with clinically amyopathic dermatomyositis (CADM): clinical significance and diagnostic utility. **Cuesta-Mateos C***, Colom-Fernández B*, Portero-Sainz I, Tejedor R, García-García C, Concha-Garzón MJ, De las Heras-Alonso ME, Martínez MA, Juárez C, Muñoz-Calleja C. J Eur Acad Dermatol Venereol. 2014 Jul 28. * Igual contribución de ambos autores.

Otros artículos en los que ha participado el doctorando

Tie-2 is overexpressed by monocytes in autoimmune thyroid disorders and participates in their recruitment to the thyroid gland. Figueroa-Vega N, Alfonso-Pérez M, **Cuesta-Mateos C**, Sánchez-Madrid F, Moreno-Otero R, González-Amaro R, Marazuela M. J Clin Endocrinol Metab. 2009 Jul;94(7):2626-33.

Premios concedidos al doctorando durante el desarrollo de su tesis doctoral

Premio Profesor Durantez (2011) al trabajo titulado “*Analysis of migratory and prosurvival pathways induced by the homeostatic chemokines CCL19 and CCL21 in B-cell chronic lymphocytic leukemia*”, otorgado por la Fundación LAIR al mejor trabajo de investigación en inmunoterapia contra el cáncer.